

**Funktioneller Vergleich von S/MARs
(‘scaffold/matrix attachment regions’) und
Insulatoren im chromosomalen Kontext**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Alexandra E. M. Baer
aus Braunschweig

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel
eingereicht am:	10.06.2002
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.08.2002
 Druckjahr:	 2002

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Baer, A. and Bode, J. (2001). Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 473-480.

Bode, J., Götze, S., Ernst, E., Hüsemann, Y., Baer, A., Seibler, J. and Mielke, C. (2002). Architecture and utilization of highly expressed genomic sites. In: *New Comprehensive Biochemistry Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. S. Makrides, Ed., Elsevier in press.

Tagungsbeiträge

Bode, J., Baer, A., Knopp, A., Schübeler, D., Seibler, J., Benham, C., Baiker, A. and Lipps, H. J. (1999). Scaffold/matrix attached regions (S/MAR elements): Detection and activities in vivo, 9. Workshop "Beyond the identification of transcribed sequences: Functional and expression analysis" (BITS) 28.-31.10. 1999, Reston, Virginia.

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Schübeler, D., Seibler, J., Benham, C., Lipps, H.J., and Baiker, A. (2000). Role of Scaffold/Matrix-attached Regions (S/MARs) for the Function of Autonomously-Regulated Chromatin Domains. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, München 10.-13.10.00.

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H.-J., and Baiker, A. (2000). Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements. BITS-Meeting 2000.

Bode, J., Baer, A. Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H. J. and Baiker, A. (2000). Functional bordering elements in the human interferon gene cluster on 9p22 and their use for the improvement of transgenes. German Human Genome Meeting 30.11.-1.12.2000, DKFZ, Heidelberg: From Functional Genomics to Target Validation.

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Goetze, S., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C. Lipps, H. J. and Baiker, A. (2001). Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements. European Science Foundation Workshop Schloss Elmau 27.-30. September 2001: Understanding chromosome behavior: prospects for constructing chromosome-based vectors for gene therapy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
1. Einleitung	1
1.1 Organisation des Chromatins und Einfluss auf die Genexpression	1
1.1.1 DNA-Elemente an den Grenzen von Gendomänen	4
1.1.1.1 S/MAR-Elemente ('scaffold/matrix attachment regions')	5
1.1.1.2 Insulatoren	8
1.2 Sequenzspezifische Rekombination zur gezielten Modifikation des Mammaliagenoms	12
1.2.1 Das Cre/loxP-System	14
1.2.2 Das Flp/FRT-System	15
1.3 Aufgabenstellung	19
2. Ergebnisse	20
2.1 Auswirkungen von S/MAR-Elementen auf die Expressionshöhe in Klongemischen	20
2.2 Untersuchung der Wirkung von cis-agierenden Elementen auf die Genexpression unter Verwendung sequenzspezifischer Rekombination	25
2.2.1 Das Exzisionskonzept	26
2.2.2 Untersuchung der cis-agierenden Wirkung des S/MAR800 in der Zelllinie CHO K1 mithilfe des Exzisionskonzepts	28
2.2.2.1 Generierung von CHO-K1-Einzelklonen mit singulärer Kopie des Vektors 8SVbg8	28
2.2.2.2 Feststellung der Vollständigkeit der integrierten Exzisionsvektoren in CHO-K1-Klonen mit singulärer Kopie	30
2.2.2.3 Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente in CHO-K1-Klonen	30
2.2.2.4 Expression der CHO-K1-Klone nach Exzision der S/MAR-Elemente	35
2.2.3 Untersuchung der cis-agierenden Wirkung des S/MAR800 in der Zelllinie NIH 3T3 mithilfe des Exzisionskonzepts	39
2.2.3.1 Generierung von NIH-3T3-Einzelklonen mit singulärer Kopie des Vektors 8SVbg8	39
2.2.3.2 Feststellung der Vollständigkeit der integrierten Exzisionsvektoren in NIH-3T3-Klonen mit singulärer Kopie	40
2.2.3.3 Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente in NIH-3T3-Klonen	40
2.2.3.4 Expression der NIH-3T3-Klone nach Exzision der S/MAR-Elemente	42
2.3 Untersuchung von cis-agierenden Elementen durch Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch	47
2.3.1 Konzept zur vergleichenden Analyse der cis-agierenden Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren	49
2.3.2 Wirkung der cis-agierenden Elemente auf die transiente Expression	57

2.3.3 Wirkung der cis-agierenden Elemente auf die stabile Expression in Einzelkopieklonen.....	58
2.3.3.1 Generierung von Einzelklonen mit singulärer Kopie.....	58
2.3.3.2 Überprüfung der Intaktheit der integrierten Einzelkopiekonstrukte mittels PCR.....	60
2.3.3.3 Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren auf die Expressionshöhe in Einzelkopieklonen.....	63
2.3.3.4 Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren auf die Stabilität der Expression in Einzelkopieklonen.....	64
2.3.4 Analyse der Wirkung der cis-agierenden Elemente im gleichen Integrationsort mittels RMCE.....	68
2.3.4.1 Transiente Expression der Austauschkonstrukte.....	68
2.3.4.2 Generierung der Austauschklone.....	69
2.3.4.3 Strategien zur Anreicherung des Austauschereignisses.....	72
2.3.5 Bewertung des Austauschsystems und alternative Austauschstrategien.....	73
2.3.6 Einfluss des SV40-Enhancers auf die Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren in Klongemischen.....	78
2.3.6.1 Einfluss auf die Expressionshöhe.....	79
2.3.6.2 Einfluss auf die Stabilität der Expression.....	82
3. Diskussion.....	86
3.1 Die Untersuchung von S/MAR-Elementen im chromosomalen Kontext.....	87
3.2 Die S/MAR-Elemente E und W steigern die Expression benachbarter Transgene in Klongemischen.....	88
3.3 Die Untersuchung von S/MAR-Elementen vor dem gleichen genomischen Hintergrund mittels Exzision.....	90
3.3.1 Die Wirkung der Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente auf die Expressionshöhe hängt vom Integrationsort ab.....	91
3.3.2 Die S/MAR800-Elemente stabilisieren die Expression.....	94
3.4 Die Analyse cis-agierender Elemente mittels RMCE.....	96
3.4.1 Die S/MAR-Elemente und Insulatoren haben keinen Einfluss auf die transiente Expression.....	97
3.4.2 Die S/MAR-Elemente E und W sowie der cHS4-Insulator erhöhen die Expression von Einzelkopieklonen.....	98
3.4.3 Sind S/MARs Insulatoren?.....	100
3.4.4 Die S/MAR-Elemente E und W sowie der cHS4-Insulator verringern das Ausmaß von Inaktivierungsprozessen.....	103
3.4.5 Der Kassettenaustausch durch Anreicherung mit Negativselektion ist in der Zelllinie CHO K1 ohne Selektion auf Flp-Expression nicht durchführbar.....	105
3.4.6 Alternative RMCE-Strategien in CHO-Zellen.....	108
3.5 Die S/MAR- und Insulator-Wirkung wird von der Anwesenheit des SV40-Enhancers und von der Zelllinie beeinflusst.....	111
3.6 Mechanismen der S/MAR-Wirkung.....	114

3.7 Relevanz von S/MAR-Elementen für gentherapeutische und biotechnologische Anwendungen.....	116
4. Material und Methoden.....	118
4.1 Geräte.....	118
4.2 Material.....	120
4.3 Allgemeine Grundtechniken.....	122
4.3.1 Sterilisieren.....	122
4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren.....	122
4.3.3 Fällung von Nukleinsäuren.....	122
4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	122
4.3.4.1 Photometrische Bestimmung.....	122
4.3.4.2 Fluorometrische Bestimmung.....	123
4.4 Arbeiten mit <i>E.coli</i>	123
4.4.1 <i>E.coli</i> -Stämme.....	123
4.4.2 Kulturmedien für Bakterien.....	124
4.4.3 Herstellung von Agarplatten.....	124
4.4.4 Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	124
4.4.5 Elektrottransformation von <i>E.coli</i>	124
4.4.6 Konservieren von Bakterienkolonien.....	125
4.5 Isolierung von Nukleinsäuren.....	125
4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der 'Boiling Prep'-Methode (nach Dan Cimbora, FHCR, Seattle).....	125
4.5.2 "Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen).....	126
4.5.3 DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit.....	127
4.5.4 Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit'.....	127
4.5.5 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen.....	127
4.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	128
4.6 DNA-Modifizierung.....	128
4.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	128
4.6.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden.....	129
4.6.3 Dephosphorylierung.....	129
4.6.4 Ligation zur Transformation.....	129
4.7 Charakterisierung von Nukleinsäuren.....	130
4.7.1 „Polymerase chain reaction“ (PCR).....	130
4.7.2 Sequenzierung von DNA.....	133
4.8 Radioaktive Nachweismethoden.....	133
4.8.1 Markierung von DNA.....	133
4.8.1.1 Random priming mit "Rediprime DNA Labelling System".....	133
4.8.1.2 Klenow-Markierung.....	133
4.8.2 'Southern Blotting'.....	134
4.8.2.1 Transfer.....	134
4.8.2.2 Hybridisierung.....	135

4.8.2.2.1 Hybridisierung mit Phosphatpuffer.....	135
4.8.2.2.2 Hybridisierung mit Dextransulfat-Hybridisierungslösung.....	136
4.8.3 Northern Transfer.....	137
4.8.3.1 Hybridisierung von Northern Blots.....	138
4.9 Gelelektrophorese.....	139
4.9.1 Agarose Gelelektrophorese.....	139
4.9.2 Formaldehyd-Agarosegele.....	139
4.10 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen.....	140
4.10.1 Verwendete Zellen.....	140
4.10.2 Medien und Lösungen.....	140
4.10.3 Kultivierung von Zelllinien.....	141
4.10.4 Passagieren.....	141
4.10.5 Langzeitlagerung von Zellen.....	141
4.10.6 Gentransfermethoden.....	142
4.10.6.1 Transfektion mittels Kopräzipitation.....	142
4.10.6.2 Transfektion mittels ‘GenePORTER™ Transfection Reagent’ (Peqlab).....	142
4.10.6.3 Transfektion mittels ‘GenePORTER™2 Transfection Reagent’ (Peqlab).....	143
4.10.6.4 Transfektion mittels Elektroporation.....	143
4.10.7. Durchführung einer Selektion.....	144
4.11 Magnetische Sortierung von Zellen mit dem MACSelect K ^k .II-Kit (Miltenyi Biotech).....	144
4.12 Proteinanalytik.....	146
4.12.1 Nachweis für β -Galaktosidase.....	146
4.12.1.1 Färbung von Zellen.....	146
4.12.1.2 β -Galaktosidase aus Zellextrakten.....	146
4.12.2 Nachweis von Luziferase (Aktivitätstest nach Williams et al., 1989).....	147
4.12.3 Nachweis von GFP.....	148
4.12.3.1 ... im Fluoreszenzmikroskop.....	148
4.12.3.2 ... im FACS.....	148
4.12.4 Nachweis von DsRed im FACS.....	148
5. Plasmide und Oligonukleotide.....	149
5.1 Plasmide.....	149
5.1.1 Verwendete Plasmide.....	149
5.1.2 Hergestellte Plasmide.....	151
5.2 Oligonukleotide.....	154
5.2.1 Oligonukleotide zur Klonierung.....	154
5.2.2 PCR-Primer.....	155
6. Abkürzungen und Zeichen.....	156
7. Literatur.....	161

Zusammenfassung

S/MAR-Elemente spielen eine strukturgebende Rolle bei der Ausbildung unabhängig regulierter Gendomänen im eukaryontischen Chromatin. Zudem scheinen sie ebenfalls an der Regulation dieser Domänen beteiligt zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser Elemente auf die Expressionseigenschaften von Transgenen mit verschiedenen Untersuchungssystemen überprüft.

Eine Analyse in Klongemischen der Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 zeigte eine deutliche transkriptionsaktivierende Wirkung dieser Elemente auf die Expression eines Reportergens und eines Selektionsmarkers. Es wurde jedoch deutlich, dass die Anwesenheit zweier exprimierter Gene die Bewertung der gemessenen Effekte erschwert. Da der Integrationsort einen nicht vorhersagbaren Einfluss auf die Transgenexpression hat, wurde im folgenden die S/MAR-Wirkung vor einem definierten genomischen Hintergrund untersucht.

Zunächst wurden durch Cre/loxP- und Flp/FRT-vermittelte Exzision zwei ein Reportergen flankierende S/MAR-Elemente entfernt. Die Deletion der Elemente konnte in CHO-K1- sowie in NIH-3T3-Zellen in den meisten Integrationsorten effizient durchgeführt werden. Die Analyse der Expression vor und nach Exzision der S/MAR-Elemente im gleichen Genort ergab eine starke Abhängigkeit der S/MAR-Wirkung von der chromosomalen Umgebung. In einigen Integrationsorten wurde die Expressionshöhe nach Exzision aktiviert, in anderen reprimiert. Dies deutet auf einen von Positionseffekten abschirmenden Einfluss der untersuchten S/MAR800-Elemente hin. Zudem wirkten die S/MAR-Elemente der Inaktivierung der Expression einzelner Zellen ('gene silencing') entgegen.

Weiterhin wurde ein auf Flp-vermitteltem Kassettenaustausch basierendes Konzept entwickelt, welches die vergleichende Untersuchung von S/MAR-Elementen, Insulatoren und Kontrollsequenzen in charakterisierten genomischen Orten ermöglichen sollte. Aufgrund der hohen Spontanresistenz der verwendeten CHO-K1-Zellen gelang die Anreicherung des Austauschereignisses über Negativselektion auf den Verlust des Markers Thymidinkinase hin jedoch nicht. Erste Versuche in Klongemischen zeigten, dass diese Limitation durch die Verwendung zweier Anreicherungsstrategien überkommen werden kann. Durch Untersuchungen von Einzelklonen wurde ein aktivierender und von der chromosomalen Umgebung abschirmender Einfluss der S/MAR-Elemente und Insulatoren auf die Höhe der Expression des flankierten Reporters festgestellt. Auch verringerten diese Elemente das Ausmaß von Expressionsinaktivierung. Expressionsstudien in Klongemischen machten eine starke Abhängigkeit der cis-agierenden Wirkung von der Zelllinie sowie von der Anwesenheit eines Enhancers deutlich.

1. Einleitung

1.1 Organisation des Chromatins und Einfluss auf die Genexpression

Die Erbsubstanz einer haploiden menschlichen Zelle besteht aus 3×10^9 Basenpaaren und würde in ausgestrecktem Zustand die Länge von einem Meter besitzen. Ihre Verpackung in den nur wenige Mikrometer großen Zellkern erfordert daher eine hochorganisierte Komprimierung. Die durch Assoziation mit verschiedenen Proteinen erreichte Kondensation der DNA ist Voraussetzung für die Aufteilung der genetischen Information während der Zellteilung. Zusammen mit einer Gruppe basischer Proteine, den Histonen, bildet die eukaryontische DNA das sogenannte Chromatin. Mikroskopisch lassen sich zwei unterschiedlich stark kondensierte Formen des Chromatins unterscheiden, welche nicht nur der strukturellen Organisation dienen, sondern auch entscheidenden Einfluss auf die Genexpression haben. Das während der Interphase des Zellzyklus locker verpackte Euchromatin beherbergt zumeist transkriptionell aktive Gene, während das stark kondensierte Heterochromatin mit transkriptioneller Inaktivität assoziiert ist. Einige Genomabschnitte sind in ihrer Kondensationsform stark dynamisch, was eine vom Differenzierungsgrad und Entwicklungsstadium abhängige Expression unterschiedlicher Gene ermöglicht.

Die erste Verpackungsstufe der DNA bildet das Nukleosom, in welchem 146 bp der Doppelhelix um ein Oktamer aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden sind. So wird eine 6-7fache Komprimierung erreicht. In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Histone nicht nur strukturelle Funktion haben, sondern auch entscheidenden Einfluss auf die Transkriptionsregulation ausüben. Dies wird durch unterschiedliche Modifikationen erreicht. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren acetyliert Lysinreste der aminoterminalen Domäne von Histonen, was deren positive Ladung herabsetzt und zu einer schwächeren DNA-Bindung führt. Die daraus resultierende lokale Destabilisierung von DNA-Histon-Interaktionen erleichtert den Zugang der Transkriptionsmaschinerie für die nukleosomale DNA (Übersichten in Wolffe und Pruss, 1996; Wade et al., 1997; Grunstein, 1997). Als Gegenspieler der Histonacetyltransferasen gelten die Histondeacetylasen, welche die Transkription inhibieren. Sie werden durch das Protein MeCP2 rekrutiert, welches an methylierte CpG-Inseln in nukleosomaler DNA bindet (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998; Übersicht in Bestor, 1998). Kürzlich wurde die Bedeutung weiterer Histonmodifikationen

klar. Auch Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung verschiedener Aminosäuren im Aminoterminal der Histone sind mit Aktivierung oder Reprimierung der Transkription korreliert. Aus dieser Beobachtung entwickelte sich die Vorstellung, dass ein „Histon Code“ existiert, d.h. unterschiedliche Modifikationsmuster werden durch die Transkriptionsmaschinerie erkannt und beeinflussen Art und Reihenfolge weiterer zu rekrutierender Faktoren (Übersicht in Berger, 2002). Eine Analyse der Modifikationen von Histon H3 im β -Globin-Gencluster des Huhns zeigte, dass transkribierte Bereiche reich an acetyliertem Lysin 9 und methyliertem Lysin 4 sind, während inaktives Chromatin durch Methylierung von Lysin 9 gekennzeichnet ist (Litt et al., 2001).

Die Position der Nukleosomen ist zumeist statistisch verteilt, jedoch sind regulatorische Regionen von Genen oftmals frei von Nukleosomen (Grunstein, 1990). Positionierte Nukleosomen sind im 5' Bereich des humanen β -Interferongens (Bode et al., 1986) und im MMTV-Promotor (Richard-Foy und Hager, 1987) zu finden. Die Position der Nukleosomen wird wahrscheinlich zum einen durch die Sequenz der DNA vorgegeben. Das Vorkommen kurzer AT-reicher Sequenzen erleichtert die Windung um das Nukleosom (Simpson, 1986; Travers, 1987). Zum anderen ist die Position einzelner Nukleosomen von der Transkriptionsaktivität und dem Acetylierungsgrad der Histone abhängig (Armstrong und Emerson, 1998).

Der DNA-Abschnitt zwischen den Nukleosomen hat eine variable Länge von 0 bis 80 Basenpaaren und wird als 'linker'-DNA bezeichnet. Diese besitzt eine hohe Sensitivität gegenüber DNA-abbauenden Enzymen. Das Histon H1 bindet sowohl an das Nukleosom als auch an die 'linker'-DNA. Wechselwirkungen zwischen den H1-Molekülen führen zur Ausbildung der nächst höheren Verpackungsform der DNA, der 30nm-Faser. Es bestehen verschiedene Modellvorstellungen zur räumlichen Anordnung der 30nm-Faser (Felsenfeld und McGhee, 1986; Thoma, 1988), jedoch ist ihre Struktur noch nicht komplett geklärt. Das Solenoid-Modell von Finch und Klug (1976) beschreibt eine spiralförmige Aufwicklung der Nukleosomenkette. Pro Windung sind 6 bis 8 Nukleosomen enthalten und es wird eine Komprimierung um das 40fache erreicht. Aufgrund der starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den H1-Molekülen ist diese Struktur unzugänglich für Transkriptionsfaktoren und bildet somit einen transkriptionell inaktiven Bereich aus.

Die gängige Modellvorstellung der Chromatinstruktur höherer Ordnung geht von einer Organisation des Interphase-Chromatins in unabhängige schlaufenförmige Domänen in einer

Größe von 5-200 kbp aus, welche im Interphasekern zu einer weiteren Komprimierung um das 10-15fache führt. Die Schlaufenstruktur wird durch die Bindung von an der Basis der Schleifen gelegenen DNA-Sequenzen an die Kernmatrix ausgebildet. So bildet jede Schlaufe eine unabhängige funktionelle Einheit. Diese DNA-Abschnitte werden als ‘scaffold/matrix attachment regions’ (S/MAR) bezeichnet und unter 1.1.1.1 genauer beschrieben.

Die Kernmatrix ist im Gegensatz zur äußeren Kernlamina ein Netzwerk aus Proteinfasern und heterogener nukleärer RNA (hnRNA), welches das gesamte Innere des Zellkerns durchzieht und wahrscheinlich mit Cytoskelettelementen des Cytoplasmas interagiert (Wan et al., 1999). Dieses Proteingerüst, an welchem die DNA-Schleifen fixiert sind, wird als ‘nuclear matrix’ (Berezney und Coffey, 1974), ‘nuclear scaffold’ (Paulson und Laemmli, 1977), ‘nucleoskeleton’ (Miller et al., 1978) oder ‘nuclear matrix-pore complex lamina fraction’ (NMPCL, Fisher et al., 1982) bezeichnet. Es wird durch selektive Extraktion von Kernen erhalten, wobei Histone, weitere lösliche Proteine und DNA entfernt werden. Zunächst wurden Matrixpräparationen durch Hochsalzextraktion (2M NaCl) isoliert (Berezney und Coffey, 1974), schonender ist jedoch die Extraktion mit dem Detergenz-ähnlichen LIS-Salz (Lithium-3’,5’-diiodosalicylat, Mirkovitch et al., 1984), welche durch physiologische Ionenstärken Artefakte vermeidet.

Die Kernmatrix besteht sowohl aus strukturgebenden als auch aus regulatorischen Proteinen (Übersicht in Bode et al., 2000a). Zu den strukturellen Proteinen zählen die Intermediärfilament-bildenden Lamine A-C (Ludérus et al., 1992 und 1994). Ein Protein, welches sowohl strukturgebende als auch regulatorische Funktion besitzt, ist die Topoisomerase II, welche in vielen Zellen das am häufigsten vertretene Nichthistonprotein ist (Gasser et al., 1986; Mirkovitch et al., 1988). Dieses Enzym kann durch die Einführung und erneutes Schließen von Doppelstrangbrüchen topologische Spannungen der DNA auflösen, ist an der Chromosomenkondensation beteiligt (Übersicht in Hirose und Ohta, 1990) und vermutlich auch durch Veränderung der Zugänglichkeit der DNA an der Genregulation. Weitere an nukleären Prozessen beteiligte und in der Kernmatrix enthaltene Proteine sind die DNA-Polymerasen α und β (Foster und Collins, 1985), die RNA-Polymerase II (Lewis et al., 1984), die DNA-Methyltransferase (Burdon et al., 1985) und sowohl Histondeacetylasen als auch Acetyltransferasen (Hendzel et al., 1991 und 1994). Neben den Laminen A und B bindet eine Reihe weiterer Proteine an die an der Basis der Chromatinschleifen gelegenen S/MAR-Elemente (Übersicht in Bode et al., 2000a). Zu diesen zählen unter anderem SAF-A (Roemig

et al., 1992), SAF-B (Renz und Fackelmayer, 1996), SATB1 (Dickinson et al., 1992 und 1997) und ARBP/MeCP2 (von Kries et al., 1991; Weitzel et al., 1997), welche in Prozesse wie RNA-Verpackung, Splicing und Methylierung involviert sind. Die *in vivo*-Bindung von S/MAR-Elementen konnte für SATB1 und SAF-A nachgewiesen werden (de Belle et al., 1998; Fackelmayer, 1994). Da die Kernmatrix mit Transkription, Splicing, DNA-Replikation und DNA-Reparatur assoziiert ist (Übersicht in Berezney et al., 1995), besteht die gängige Vorstellung, dass sie eine „Plattform“ für die im Kern ablaufenden Prozesse darstellt, welche DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbindet.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts konnten durch Verbesserungen in der spezifischen Fluoreszenzmarkierung von Chromatin sowie durch verbesserte Bildanalyse entscheidende Fortschritte in der Aufklärung der Architektur des Zellkerns gemacht werden. So wurde ein Modell entwickelt, welches von der Existenz dreier grundlegender Kernkompartimente ausgeht (Cremer et al., 2000; Cremer und Cremer, 2001). Die größten Subkompartimente im Interphasekern werden durch Bereiche gebildet, die jeweils nur die DNA eines bestimmten Chromosoms enthalten. Diese sogenannten „Chromosomen-Territorien“ werden weiter unterteilt in ein „offenes“ Chromatinkompartiment, welches aktive Gene enthält, und ein stärker kondensiertes, in welchem sich inaktive Gene befinden. Das dritte Kompartiment, die Interchromatindomäne, enthält Makromolekül-Komplexe für Transkription, Splicing, Replikation und Reparaturvorgänge. Nur Gene, welche sich im „offenen“ Chromatinkompartiment befinden, haben Zugang zur Interchromatindomäne und den darin gelegenen Transkriptionskomplexen. In dem beschriebenen Modell entspricht die Interchromatindomäne der Kernmatrix.

1.1.1 DNA-Elemente an den Grenzen von Gendomänen

Die DNA-Sequenzen, welche die oben beschriebenen schlaufenförmigen Chromatindomänen begrenzen, haben nicht nur eine strukturelle Bedeutung, sondern sind auch in die Regulation der Genaktivität involviert. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von DNA-Elementen, welche an den Grenzen von Gendomänen lokalisiert sind (Übersicht in Mishra und Karch, 1999), S/MAR-Elemente und Insulatoren (Isolatoren; abgeleitet vom engl. ‘insulators’), welche zusammenfassend als ‘boundary elements’ bezeichnet werden.

1.1.1.1 S/MAR-Elemente ('scaffold/matrix attachment regions')

S/MAR-Elemente bilden durch Verankerung an die Kernmatrix die Basis der Chromatinschleifen. Diese Bindung ist die Grundlage zweier biochemischer Verfahren zur Identifizierung von S/MAR-Elementen. Bei der ersten Methode, dem 'halo mapping', werden durch LIS-Extraktion Histone und andere lösliche Proteine aus dem Zellkern extrahiert. Die so erhaltene Kernmatrix ist mit einer Wolke genomischer DNA umgeben, welche als „Kern-Halo“ bezeichnet wird. Es folgt ein Verdau mit Restriktionsenzymen und die Abtrennung der frei gewordenen DNA. Die assoziierten Bereiche können nach Proteinabbau im Southern Blot identifiziert werden. Die zweite Methode beruht auf der Bestimmung der Affinität eines DNA-Abschnitts zur Kernmatrix *in vitro*. Bei diesen Reassoziationsexperimenten werden die zu untersuchenden DNA-Fragmente in Gegenwart prokaryontischer S/MAR-freier Kompetitor-DNA mit einer in der oben beschriebenen Weise hergestellten Kernmatrixpräparation inkubiert und ihre Bindungsstärke bestimmt. Diese Methode kann als standardisierter Test zur Untersuchung des S/MAR-Charakters beliebiger Sequenzen eingesetzt werden (Kay und Bode, 1995). Ursprünglich wurden die durch 'halo mapping' gefundenen Elemente als „SARs“ bezeichnet (Gasser und Laemmli, 1986) und die durch Reassoziationsanalysen identifizierten Elemente als „MARs“ (Cockerill und Garrard, 1986). Da sich zeigte, dass beide Methoden die gleichen Elemente nachweisen, werden sie inzwischen häufig zusammenfassend als „S/MARs“ bezeichnet.

Inzwischen wurden S/MARs aus verschiedenen eukaryontischen Organismen wie der Hefe (Amati und Gasser, 1990), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Mirkovitch et al., 1984; Gasser und Laemmli, 1986) sowie aus Pflanzen wie Tabak (Hall et al., 1991), Kartoffel (Bode und Willmitzer, unveröffentlicht), Petunie (Dietz et al., 1994), Mais und *Arabidopsis thaliana* (Paul und Ferl, 1998) identifiziert und charakterisiert. Die meisten S/MAR-Elemente wurden bislang in der genomischen DNA von tierischen Organismen und dem Menschen entdeckt, wo sie an der Organisation komplexer Genloci beteiligt zu sein scheinen. Hierzu zählen die S/MAR-Elemente aus der Lysozymdomäne des Huhns (Phi-Van und Strätling, 1988), aus den Loci der Immunglobulinketten der Maus (Cockerill und Garrard, 1986; Cockerill et al., 1987 und 1990), aus dem murinen TCR β -Locus (Chattopadhyay et al., 1998), aus dem DHFR-Locus des Hamsters (Käs und Chasin, 1987; Dijkwel und Hamlin, 1995), aus dem β -Lactoglobulin-Locus des Schafs (Whitelaw et al., 2000), aus dem murinen und

humanen β -Interferon-Locus (Mielke et al., 1990; Bode und Maaß, 1988), aus der humanen Apolipoprotein B Domäne (Levy-Wilson und Fortier, 1989) sowie aus dem β -Globin-Gencluster des Menschen (Jarman und Higgs, 1988). Für eine hohe funktionelle Konser-
vierung von S/MAR-Elementen spricht weiterhin die Beobachtung, dass auch Sequenzen aus dem humanen Papillomvirus Typ 16 an die Kernmatrix binden (Tan et al., 1998).

S/MAR-Elemente besitzen eine Länge von 200 bis 7000 Basenpaaren. Gemeinsam ist ihnen, dass sie ausschließlich in nicht kodierenden DNA-Bereichen vorkommen. In komplexen Genloci sind sie häufig an den Grenzen der Domänen lokalisiert (Übersicht in Gasser und Laemmli, 1987), sie kommen aber auch in Introns vor, wie z.B. im humanen β -Globingen (Jarman und Higgs, 1988) und den murinen Immunglobulingenen (Cockerill et al., 1987). Eine typische Eigenschaft dieser Elemente ist ein AT-Gehalt von ungefähr 70%, welcher jedoch nicht für Matrixbindung ausreichend ist. S/MAR-Elemente weisen keine Homologien auf, jedoch konnten wiederholt auftretende Sequenzmotive identifiziert werden. Beispielsweise kommen häufig Bindungsstellen für Topoisomerase II vor. Typische Sequenzmotive sind weiterhin das ATATTT-Motiv (Cockerill und Garrard, 1986; Mielke et al., 1990), Motive, die zu einer gebogenen DNA-Konformation ('bending') führen, und poly(dAdT)-Bereiche (Adachi et al., 1989; Käs et al., 1989). Eine wesentliche Eigenschaft von S/MAR-Elementen ist ihr Potenzial zur Strangtrennung, welche mit der Matrixbindung korreliert (Bode et al., 1992). Basierend auf diesen Eigenschaften wurden Computerprogramme zur Vorhersage von S/MAR-Elementen entwickelt. Das SIDD-Profil von Benham et al. (1997) berechnet das Potenzial zu testender Sequenzen zur Strangtrennung, während der MAR-Finder (Singh et al., 1997) auf der Identifizierung S/MAR-spezifischer Sequenzmotive beruht. Das Auftreten von S/MAR-Elementen in komplex regulierten eukaryontischen Genloci (siehe oben) lässt vermuten, dass sie nicht nur eine strukturgebende Funktion hinsichtlich der Ausbildung der Chromatinschleifen besitzen, sondern auch Einfluss auf die Genregulation nehmen. Dies konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen nachgewiesen werden. In Transfektionsexperimenten in Säugerzellen wurde eine transkriptionsfördernde Wirkung verschiedener S/MARs gezeigt (Stief et al., 1989; Klehr et al., 1991 und 1992; Poljak et al., 1994; Kalos und Fournier, 1995; Stünkel et al., 2000). Der transkriptionsfördernde Effekt tritt nur nach stabiler Integration ins Genom auf (Klehr et al., 1991; Schübeler et al., 1996; Kalos und Fournier, 1995; Stünkel et al., 2000; Übersicht in Allen et al., 2000), was S/MARs von Enhancern unterscheidet, welche auch transient wirken. Eine Korrelation der *in vitro*

Matrixbindung mit der transkriptionsfördernden Eigenschaft wurde von Bode et al. 1992 gezeigt, jedoch scheint Matrixbindung allein nicht ein ausreichendes Kriterium für Transkriptionssteigerung zu sein (Phi-Van und Strätling, 1996). Der Mechanismus der Transkriptionsverstärkung ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist denkbar, dass S/MARs durch ihre Bindung an die Kernmatrix Gene in Kernkompartimente dirigieren, welche eine hohe Konzentration von Transkriptionsfaktoren besitzen. Alternativ könnten S/MARs durch Matrixbindung vor der Integration die Klasse der Integrationsorte beeinflussen ('Targeting'-Effekt). Möglicherweise können S/MARs auch die bei der Transkription auftretende superhelikale Spannung beseitigen (Bode et al., 1998) oder die „Öffnung“ der Domäne fördern (Käs et al., 1993). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass S/MAR-Elemente mit Mechanismen assoziiert sind, welche den Kondensationsgrad des Chromatins beeinflussen. Beispielsweise interagiert das S/MAR-bindende Protein SAF-A mit einer Histonacetyltransferase (Martens et al., 2002), welche eine für Transkriptionsfaktoren zugängliche Chromatinstruktur fördert. Weiterhin wirken S/MARs DNA-Methylierung entgegen (Dang et al., 2000), welche über MeCP2 Histondeacetylasen rekrutiert und als erster Schritt der Ausbildung einer reprimierenden Chromatinstruktur angesehen wird (Razin, 1998).

Für S/MARs aus dem Lysozym-Locus des Huhns und aus den humanen Apolipoprotein-B- und α -1-Antitrysin-Loci konnte weiterhin beobachtet werden, dass sie flankierten Transgenen eine vom Integrationsort unabhängige Expression ermöglichen (Stief et al., 1989; Kalos und Fournier et al., 1995; Nameciu et al., 1998). Dies ist eine Eigenschaft, welche auch die zweite Klasse von Elementen an den Grenzen von Chromatindomänen, die Insulatoren (siehe Kap. 1.1.1.2), besitzt. Diese Beobachtungen sprechen für eine vom umliegenden Chromatin abschirmende Funktion dieser S/MAR-Elemente, welche möglicherweise durch eine Colokalisation von S/MARs und Insulatoren in diesen Elementen verursacht wird.

Es ist denkbar, dass es unterschiedliche Klassen von S/MARs gibt, welche verschiedene endogene Funktionen erfüllen. So sind die S/MARs aus dem IgH-Locus der Maus beispielsweise für die Aktivierung des Promotors durch den von ihnen flankierten Enhancer notwendig (Jenuwein et al., 1997). Sie wirken methylierungsabhängigen Inaktivierungsprozessen entgegen (Fernández et al., 1998) und fördern Histonacetylierung über eine ausgedehnte Sequenz (Forrester et al., 1999; Fernández et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass einige S/MARs für die zellspezifische Expression einiger Gene wichtig sind. So sind S/MAR-Elemente an der Regulation der zelltyp-abhängigen Expression des humanen

Apolipoproteins B durch Ausbildung unterschiedlicher Schlaufenstrukturen in Leber und Dünndarm beteiligt (Antes et al., 2001).

1.1.1.2 Insulatoren

Die zweite Klasse von DNA-Elementen, welche sich an den Grenzen von Gendomänen befinden, sind die Insulatoren. Es gibt zwei Kriterien, einen Insulator zu definieren. Ursprünglich wurden sie durch ihre Fähigkeit detektiert, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen. Die zweite Wirkung ist die sogenannte ‘Enhancer Blocking’ Aktivität. Bei Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor blockieren Insulatoren die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer. Die meisten Insulatoren wurden bislang in *Drosophila* identifiziert, doch kommen sie auch in Vertebraten und Hefe vor (Übersicht in Bell und Felsenfeld, 1999 sowie Mishra und Karch, 1999). Die ersten beschriebenen Insulator-Elemente sind *scs* und *scs'*, welche die *hsp70* Hitzeschockgene aus *Drosophila* flankieren. Sie besitzen ‘Enhancer Blocking’ Aktivität (Kellum und Schedl, 1992) und schirmen das *white*-Gen bei Flankierung von Positionseffekten ab (Kellum und Schedl, 1991). Ein zweites *Drosophila*-Element, *gypsy*, ist ein Retrotransposon und mit keiner Domänengrenze assoziiert. Es wurde in gewebespezifischen Mutationen entdeckt, die durch eine Insertion von *gypsy* zwischen Promotor und Enhancer und den daraus resultierenden ‘Enhancer Blocking’ Effekt verursacht waren (Geyer und Corces, 1992). Weiterhin schirmt auch *gypsy* von Positionseffekten ab (Roseman et al., 1993).

Der am besten charakterisierte Vertebraten-Insulator ist die DNase I hypersensitive Site 4 aus dem 5' Bereich des β -Globingenclusters des Huhns (5'HS4 oder cHS4). Ein 1,2 kbp großes Fragment, welches die hypersensitive Site enthält, besitzt ‘Enhancer Blocking’ Aktivität und schirmt von Positionseffekten in *Drosophila* ab (Chung et al., 1993). Auch schützt dieser Insulator in Vertebraten-Zelllinien vor Positionseffekten und wirkt Expressionsverlust durch Verhinderung von Histondeacetylierung entgegen (Pikaart et al., 1998).

Ebenso wie S/MAR-Elemente besitzen auch Insulatoren keine Konsensus-Sequenz. Jedoch kommen in allen Insulatoren DNase I hypersensitive Sites vor, welche ein Indiz für Proteinbindung sind. Tatsächlich wurde eine Reihe Insulator-bindender Proteine identifiziert,

welche sich zwischen Vertebraten, *Drosophila* und Hefe unterscheiden und keine Homologien zueinander besitzen. An das 250 bp große ‘Core’ Fragment des cHS4-Insulators bindet das ubiquitär exprimierte Protein CTCF (‘CCCTC-binding factor’; Bell et al., 1999). CTCF besitzt vielfältige Rollen in Transkriptions-Aktivierung und –Inaktivierung und bindet auch an andere Insulator-Sequenzen aus Vertebraten. Die CTCF-Bindungsstelle ist im cHS4-Insulator essentiell für die ‘Enhancer Blocking’ Aktivität, nicht jedoch für die Fähigkeit, von Positionseffekten abzuschirmen (Bell et al., 1999). Im endogenen Kontext ist der Insulator zwischen den β -Globingenen und dem unabhängig regulierten 5’ gelegenen Folatrezeptorgen gelegen. Es ist wahrscheinlich, dass die ‘Enhancer Blocking’ Aktivität eine unangemessene Aktivierung dieser Gene durch regulatorische Elemente der jeweils anderen Domäne verhindert, während die Fähigkeit, von Positionseffekten abzuschirmen, der Ausbreitung einer zwischen diesen Domänen gelegenen kondensierten Chromatinstruktur entgegenwirkt (Prioleau et al., 1999). Stromabwärts der β -Globingene befindet sich im Huhn ebenfalls ein Insulator (3’HS), welcher diese von einem in anderen Geweben exprimierten Gen für einen Geruchsrezeptor trennt (Saitoh et al., 2000). 3’HS bindet ebenfalls CTCF. Weitere Insulatoren, welche sich zwischen unterschiedlich regulierten Domänen befinden und CTCF-Bindestellen besitzen, sind der BEAD-Insulator (‘blocking element alpha/delta’), der die TCR α - und TCR δ -Gene und deren Enhancer voneinander trennt (Zhong und Krangel, 1997) sowie die ‘Repeat Organizer’ zwischen den 40S rRNA-Genen in *Xenopus* (Robinett et al., 1997).

Die Insulator-Funktion ist nicht grundsätzlich konstitutiv, sondern kann auch reguliert werden. Die ‘Imprinting Control Region’ zwischen den Genen Igf2 und H19 wird im maternal vererbten Allel von CTCF gebunden, was die Aktivierung von Igf2 durch einen stromabwärts gelegenen Enhancer verhindert. Im paternal vererbten Allel hingegen kann CTCF aufgrund von Methylierung des Insulators nicht binden und Igf2 wird exprimiert (Hark et al., 2000). In *Drosophila* werden die entwicklungsspezifisch regulierten Enhancer *iab-7* und *iab-8* durch den *Fab-8*-Insulator voneinander getrennt. Jedoch erlaubt die Anwesenheit einer ‘Promoter-targeting sequence’ die Aktivierung des 3’ gelegenen *Abd-B* Promotors durch *iab-7*, obwohl der Insulator zwischen diesen Elementen gelegen ist (Zhou und Levine, 1999). Der dieser Regulation zugrunde liegende Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht bekannt. Die molekulare Wirkungsweise von Insulatoren ist noch weitgehend unverstanden. Zur Erklärung der ‘Enhancer Blocking’ Aktivität existieren verschiedene Modellvorstellungen

(Bell und Felsenfeld, 1999). So ist es denkbar, dass der Insulator ein aktivierendes Signal abfängt, welches vom Enhancer in Richtung Promotor ausgesendet wird. Alternativ ist es möglich, dass zwei einen Enhancer flankierende Insulatoren miteinander interagieren und so über Schlaufenbildung den Enhancer räumlich vom Promotor trennen. Die Erklärung der Insulator-Wirkung ist dadurch erschwert, dass auch die Wirkungsweise von Enhancern noch nicht gänzlich geklärt ist.

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Insulatoren über Beeinflussung der Chromatinstruktur wirken. An den *gypsy*-Insulator bindet das Zinkfinger-Protein Su(Hw) (Spana und Corces, 1990), welches wiederum mit dem Faktor Mod(mdg4) interagiert, der die Insulator-Wirkung modifiziert (Gerasimova et al., 1995). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Su(Hw)/Mod(mdg4)-Komplex im Interphasekern zu Clustern in Nähe der Kernperipherie zusammengelagert ist und die dazwischen liegende DNA in Schlaufen angeordnet wird (Gerasimova et al., 2000). So ist es denkbar, dass ein Enhancer nicht innerhalb anderer Schlaufen gelegene Promotoren aktivieren kann. Dieses Modell der Schlaufenorganisation kann auch die Fähigkeit zur Abschirmung reprimierender Chromatineinflüsse erklären. Möglicherweise können auch negativ regulatorische Elemente wie z.B. 'Polycomb response' Elemente nicht in einer anderen Schlaufe gelegene Gene reprimieren. An der korrekten Ausbildung der Schlaufenstruktur scheinen trxG- und PcG-Proteine beteiligt zu sein, da Mutationen in den entsprechenden Genen die Zusammenlagerung der Insulator-Komplexe verhindern (Gerasimova und Corces, 1998). Die Fähigkeit, Chromatin in Schlaufen zu organisieren, erinnert an S/MAR-Elemente (Kap. 1.1.1.1). Auch der *gypsy*-Insulator besitzt die Fähigkeit, an die Kernmatrix zu binden (Nabirochkin et al., 1998). Daher ist es denkbar, dass die Organisation des Chromatins eine dem *gypsy*-Insulator inhärente Eigenschaft ist, andere Insulatoren jedoch über andere Mechanismen wirken. Die Abschirmungsfunktion des cHS4-Insulators ist beispielsweise mit epigenetischen Modifikationen assoziiert. Er fördert Histonacetylierung (Pikaart et al., 1998) und verhindert Methylierung von Transgenen (Rivella et al., 2000). Auch Studien aus Hefe sprechen für ein Zusammenspiel von Insulator-Elementen und Histonacetyltransferasen (Donze und Kamakaka, 2001).

Die Regulation komplexer eukaryontischer Genloci scheint ein cis-regulatorisches System zu erfordern, welches aus unterschiedlichen Elementen wie Enhancern, Insulatoren und S/MAR-Elementen besteht. Diese können die Genexpression auf verschiedenen Ebenen modulieren.

Verschiedene regulatorische Elemente sind in den Locus-Kontrollregionen (LCRs) zusammengefasst (Übersicht in Li et al., 1999). Sie erstrecken sich über einen ausgedehnten Sequenzbereich und besitzen mehrere DNase hypersensitive Sites, an welche verschiedene Transkriptionsfaktoren binden. LCRs sind definiert als dominant aktivierende Sequenzen, welche positionsunabhängige Genexpression in transgenen Mäusen verleihen. Ein S/MAR-Element wurde z.B. im humanen β -Globin-LCR (Jarman und Higgs, 1988) gefunden, während der β -Globin-LCR des Huhns den cHS4-Insulator enthält. Die hypersensitiven Sites des humanen β -Globin-LCRs wirken auf die Transgenexpression synergistisch (Mollete et al., 2001). Das Verständnis der Regulation erfordert eine detaillierte Charakterisierung der beteiligten Sequenzen und Proteine.

Bisherige Arbeiten zur Untersuchung von S/MAR-Elementen beruhten meist auf klassischen Verfahren der reversen Genetik: Reportergenkonstrukte mit und ohne die zu untersuchenden Sequenzen wurden durch Transfektion in die Zelle eingebracht und der Einfluss auf die Expressionshöhe zumeist in Klongemischen oder Einzelklonen in zufälligen Integrationsorten bestimmt. Da die chromosomale Umgebung die Expressionseigenschaften erheblich beeinflusst, kann sich prinzipiell in jedem Integrationsort ein unterschiedlicher S/MAR-Effekt ergeben. Diese Studien können zwar bei Betrachtung einer großen Anzahl von Klonen Hinweise auf den Einfluss von S/MAR-Elementen liefern, zur ursächlichen Klärung ihrer Wirkung sind sie jedoch weniger geeignet. Daher sollte der Vergleich von Konstrukten mit und ohne S/MARs im gleichen chromosomalen Kontext erfolgen. So kann festgestellt werden, ob der S/MAR-Effekt dominant oder vom Integrationsort und dessen transkriptioneller Aktivität abhängig ist. Die Untersuchung der Wirkung cis-agierender Elemente im gleichen Integrationsort ist möglich durch Nutzung verschiedener auf sequenzspezifischer Rekombination (Kap. 1.2) beruhender Verfahren. Die Verwendung sequenzspezifischer Rekombinationssysteme bei der Untersuchung des 5'HS2-Enhancers aus dem humanen β -Globin-Locus vor einem definierten chromosomalen Hintergrund konnte entscheidend zur Aufklärung seiner Funktion beitragen (Walters et al., 1996; Francastel et al., 1999).

1.2 Sequenzspezifische Rekombination zur gezielten Modifikation des Mammaliagenoms

Unter Rekombination versteht man die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Strängen in der lebenden Zelle. Neben der in vielen Organismen natürlich vorkommenden homologen Rekombination, welche auf der Paarung ausgedehnter homologer Sequenzen beruht und ein häufig genutztes Werkzeug zur Generierung transgener Mäuse aus embryonalen Stammzellen ist, existieren sequenzspezifische Rekombinationssysteme aus Prokaryonten und niederen Eukaryonten, die ebenfalls zur gezielten Manipulation des Mammaliagenoms genutzt werden können. Während die homologe Rekombination in Kultur-Zelllinien aufgrund der Dominanz illegitimer Rekombinationsereignisse (Bode et al., 2000b) ineffizient ist, wird sequenzspezifische Rekombination sowohl in ES-Zellen, transgenen Mäusen, Zelllinien, Pflanzen, Hefe und *Drosophila* erfolgreich angewendet (Übersicht in Kilby et al., 1993 sowie Bode et al., 2000c). Die sequenzspezifische Rekombination erfordert keine ausgedehnten homologen DNA-Abschnitte, jedoch müssen kurze Erkennungssequenzen ('Sites') für die Rekombinase zuvor über homologe Rekombination oder klassischen Gentransfer ins Genom integriert worden sein. Nach Transfer der Rekombinase in die Zelle katalysiert diese eine basengenaue Rekombination innerhalb der homologen Erkennungsstellen. Abhängig von Lage und Orientierung dieser Erkennungsstellen können unterschiedliche Rekombinationsereignisse durchgeführt werden (Abb. 1.1). Bei inverser Orientierung der Sites auf einem DNA-Molekül führt die Rekombination zur Inversion des flankierten DNA-Abschnitts. Bei gleich orientierten Sites exzidiert die Rekombinase die zwischen diesen gelegene Sequenz. Die Rückreaktion der Exzision ist die Integration eines zirkulären Plasmids mit einer Erkennungsstelle in eine genomisch verankerte Site. Die Reaktionen sind reversibel und das Reaktionsgleichgewicht liegt auf Seiten der thermodynamisch begünstigten monomolekularen Exzision, da die Integration eine intermolekulare Reaktion ist. Die am häufigsten verwendeten Rekombinationssysteme sind das Cre/loxP-System des Bakteriophagen P1 sowie das Flp/FRT-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben werden. Diese Rekombinationssysteme gehören zur Integrase-Familie der Rekombinasen, welche nach der Integrase des Bakteriophagen λ benannt sind, die die Integration des Phagengenoms in das Chromosom des Wirts *E.coli* und auch die Exzision katalysiert. Bislang sind mehr als 30 Rekombinasen der Integrase-Familie aus verschiedenen Organismen isoliert und charakterisiert worden (Übersicht in Craig, 1988

und Sadowski, 1993). Obwohl es keine gemeinsamen DNA-Bindungsmotive gibt, ist der Reaktionsmechanismus konserviert. Im katalytischen Zentrum dieser Rekombinasen befinden sich die Aminosäuren Tyrosin, Histidin und Arginin (Argos et al., 1986). Tyrosin wird für den Strangbruch zu Beginn der Reaktion benötigt, Arginin dient der Bindung und Histidin der Verknüpfung der rekombinierten DNA-Stränge.

Eine Limitation der populären Cre/loxP- und Flp/FRT-Rekombinationssysteme ist die Ineffizienz von Integrationsreaktionen aufgrund der bevorzugten Exzisionsreaktion. Jedoch gibt es verschiedene Methoden, die Integrationsreaktion spezifisch zu fördern (Übersicht in Baer und Bode, 2001). Ein anderes Rekombinationssystem ermöglicht eine selektive Integration. Bei der Reaktion der Φ C31-Integrase eines *Streptomyces*-Phagen aus der Resolvase/Invertase-Familie der sequenzspezifischen Rekombinasen entstehen nach der Rekombination der Erkennungssequenzen *attB* und *attP* rekombinierte *att*-Sites, welche nicht

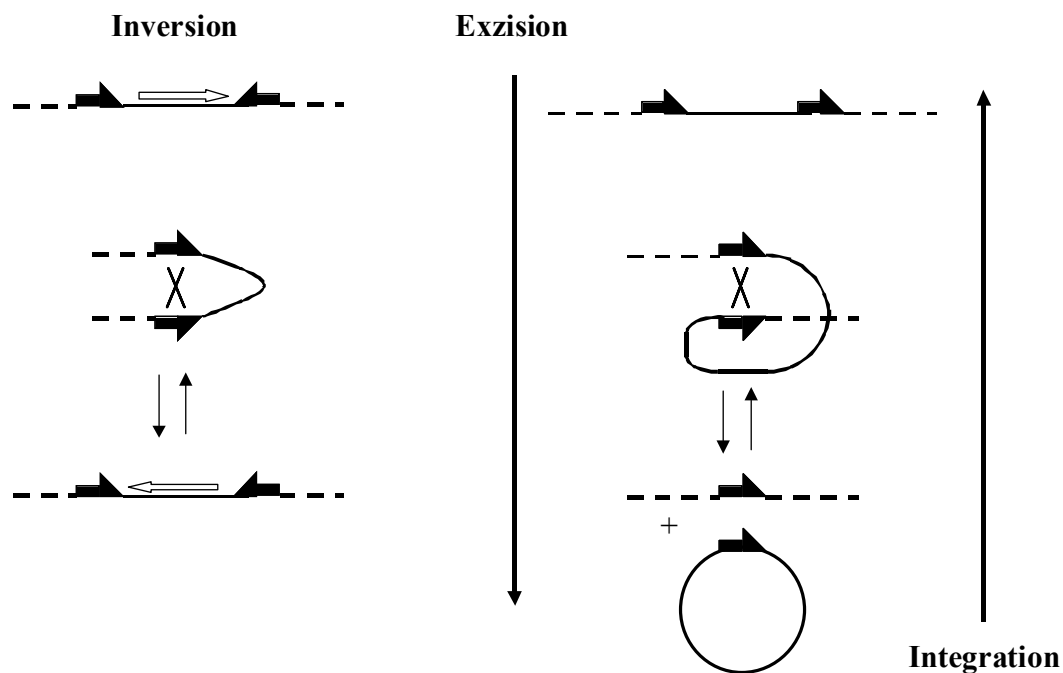


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Rekombinationsvorgänge von Rekombinasen des Integrase-Typs.

Die Enzyme der Integrase-Familie können sowohl intra- als auch intermolekulare Reaktionen durchführen. Zu den intramolekularen Prozessen gehören die Exzision und die Inversion, wobei die relative Orientierung der Rekombinase-Erkennungsstellen zueinander den Ablauf der Reaktion bestimmt. Die Integration ist eine intermolekulare Reaktion. Alle Reaktionen sind reversibel. Die Erkennungsstellen der Rekombinase sind als Halbpfeile dargestellt, die durchgezogenen Linien symbolisieren Plasmid-DNA, die unterbrochenen Linien chromosomale DNA. Der weiße Pfeil gibt die Orientierung der zwischen den invertierten Sites gelegenen DNA-Sequenz an. Die Kreuze symbolisieren den Rekombinationsvorgang.

mehr miteinander reagieren können (Thorpe et al., 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Φ C31-Integrase die effiziente sequenzspezifische Integration von Plasmiden in Mammalia-Zelllinien erlaubt (Thyagarajan et al., 2001).

1.2.1 Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System des Bakteriophagen *PI* gewährleistet den Erhalt des Phagenplasmids in *E.coli*. Die Rekombinase Cre ('causes recombination') zerlegt entsprechend der in Abb. 1.1 dargestellten Exzision die bei der Replikation entstehenden Phagendimere in Monomere und gewährleistet so eine gleichmäßige Verteilung der Phagen-DNA während der Zellteilung. Die Erkennungsstelle für die 38 kDa große Cre-Rekombinase wird als loxP-Site ('locus of crossing over of *PI*') bezeichnet und existiert einmal pro Phagengenom. Die loxP-Site besteht aus einem 8 bp langen asymmetrischen Spacer und zwei invertierten identischen Bindungsstellen für die Rekombinase (Hoess und Abremski, 1985). Die Asymmetrie des Spacers bestimmt die Orientierung der Site.

Da keine weiteren Kofaktoren für die Rekombination notwendig sind, kann das System ohne Schwierigkeiten auch in anderen Organismen angewendet werden (Übersicht in Kilby et al., 1993 und Sauer, 1994). Die Integration in eine genomisch verankerte loxP-Site wurde in permanenten Zelllinien beschrieben (Fukushige und Sauer, 1992). Weiterhin konnte ein solches 'gene targeting' in ES-Zellen effizient durchgeführt werden (Schübeler, 1998). Die häufigste Anwendung der Cre-Rekombinase ist die sequenzspezifische Exzision von DNA-Abschnitten in ES-Zellen. Li et al. (1996) konnten sehr große genomische Bereiche (200 kbp) deletieren. Weiterhin wird das Cre/loxP-System zur Entfernung von Selektionsmarkern und zum konditionellen 'knockout' von Genen in transgenen Mäusen verwendet (Übersicht in Kühn und Schwenk, 1997 sowie Nagy, 2000). Inzwischen existiert eine Reihe von Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase gewebespezifisch oder induzierbar exprimieren (Übersicht in Metzger und Feil, 2000). Ein Nachteil des Cre/loxP-Systems ist das natürliche Vorkommen von der loxP-Site ähnlichen „Pseudo-loxP-Sites“ im Mammaliengenom, welche ein Substrat für die Cre-Rekombinase darstellen (Thyagarajan et al., 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression von Cre in Maus-Spermatiden zu Chromosomen-Rearrangements führt (Schmidt et al., 2000). Die Toxizität der Cre-Rekombinase kann jedoch durch zeitliche

Beschränkung ihrer Aktivität überkommen werden (Silver und Livingston, 2001). „Pseudo-loxP-Sites“ können auch der spezifischen Integration in das Genom dienen. So entwickelten Buchholz und Stewart (2001) eine Mutante der Cre-Rekombinase, welche spezifisch eine „Pseudo-loxP-Site“ auf dem humanen Chromosom 22 erkennt.

1.2.2 Das Flp/FRT-System

Die meisten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzen ein 6318 bp großes Plasmid, welches in hoher Kopienzahl vorkommt. Dieses sogenannte 2 μ -Plasmid (Hartley und Donelson, 1980) bringt der Hefe keinen Selektionsvorteil, daher wird es als eine Form von gutartigem Parasitismus angesehen (Volkert et al., 1989). Das Plasmid besitzt zwei 599 bp große invertierte Sequenzwiederholungen, die es in zwei Hälften teilen. Innerhalb dieser Repeats befindet sich je eine Erkennungsstelle für die vom Plasmid kodierte Flp-Rekombinase. Diese Erkennungssequenzen werden als FRT-Sites (‘Flp-recombinase recognition target’) bezeichnet. Die Flp-Rekombinase hat ein Molekulargewicht von 43 kDa und führt eine sequenzspezifische Rekombination zwischen den invers orientierten FRT-Sites durch, so dass eine Hälfte des Plasmids invertiert wird. Daher kommen in der Zelle zwei Inversionsisomere vor (Abb. 1.2). Die Replikation des Plasmids erfolgt einmal pro Zellteilung. Der Replikationsursprung des 2 μ -Plasmids liegt in der Nähe einer der FRT-Sites. Hat eine der beiden bidirektionalen Replikationsgabeln die FRT-Site passiert, kann durch

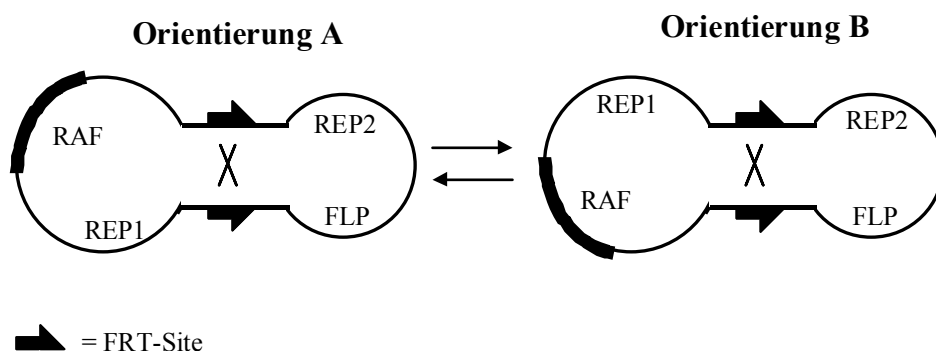


Abb. 1.2: Die zwei Inversionsisomere des 2 μ -Plasmids werden durch Flp-vermittelte Inversion ineinander überführt (nach Kilby et al., 1993).

Neben dem Gen für die Flp-Rekombinase enthält das Plasmid die Gene RAF, REP1 und REP2, welche an der Regulation des Rekombinasegens beteiligt sind (Volkert et al., 1989).

sequenzspezifische Rekombination zwischen den Sites der Verlauf der Replikation umgedreht werden, so dass sich anschließend beide Replikationsgabeln in eine Richtung bewegen. So werden trotz einmaliger Replikationsinitiation mehrere Plasmidmoleküle amplifiziert. Die entstandenen Plasmidconcatemere werden durch homologe oder Flp-vermittelte Rekombination in Monomere zerlegt (Volkert et al., 1989).

Die Flp-Rekombinase erhielt ihren Namen aufgrund des von ihr katalysierten „flip-flop-Inversionsmechanismus“ (Broach und Hicks, 1980). Die FRT-Site besteht aus einer 8 bp großen asymmetrischen Spacer-Region und drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen (Abb. 1.3). Der Spacer gibt ebenso wie bei der loxP-Site die Orientierung der Erkennungsstelle vor. Innerhalb dieser Sequenz findet der eigentliche Rekombinationsvorgang statt. Die den Spacer flankierenden invertierten Sequenzwiederholungen dienen als Bindungsstelle für die Rekombinase. Eine minimale funktionsfähige FRT-Site besteht aus der Spacer-Sequenz und den beiden flankierenden Repeats. Die dritte Sequenzwiederholung erhöht die Rekombinogenität der Site. Im Gegensatz zu Exzisionen können Integrationen nur mit einer vollständigen FRT-Site durchgeführt werden (Senecoff und Cox, 1986; Lyznik et al., 1993). Der Mechanismus der Rekombination ist in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.

Da das Flp/FRT-System keine Kofaktoren benötigt, stellt es ebenso wie das Cre/loxP-System ein geeignetes Werkzeug für sequenzspezifische Rekombinationsvorgänge in einer Vielzahl von Organismen dar. Anwendungen dieses Systems wurden in *E.coli* und *Drosophila* sowie in Mammalia- und Pflanzenkulturzellen beschrieben (Übersicht in Kilby et al., 1993). Sequenzspezifische Exzisionen von Enhancern in Kulturzelllinien trugen zur Aufklärung des Mechanismus dieser cis-agierenden Elemente bei (Walters et al., 1996). Auch in ES-Zellen

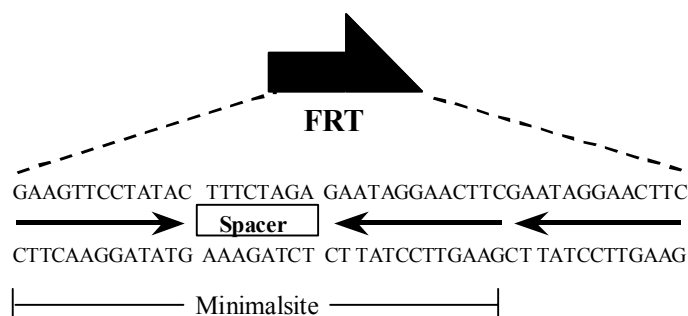


Abb. 1.3: Aufbau der FRT-Site.

Dargestellt ist die Sequenz beider DNA-Stränge. Der Spacer ist von drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen umgeben, die durch Pfeile symbolisiert werden. Die Minimalsite besteht nur aus dem Spacer und den zwei umgebenden Repeats.

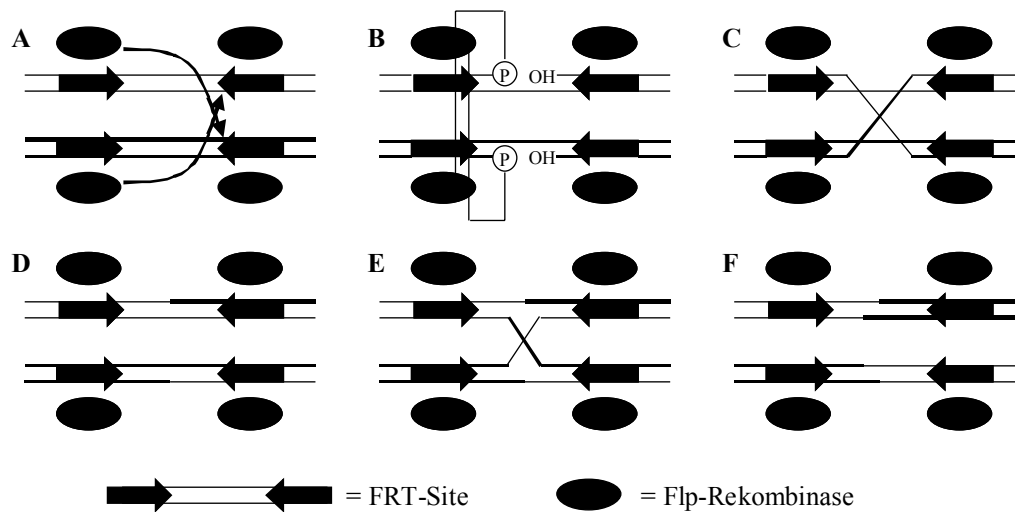


Abb. 1.4: Mechanismus des Rekombinationsvorgangs (nach Kilby et al., 1993).

Die Rekombination zwischen zwei Minimalsites ist schematisch dargestellt. Je eine Flp-Rekombinase bindet die Sequenzwiederholungen (schwarze Pfeile), welche den Spacer umgeben. Nach Schneiden der DNA am gegenüberliegenden Strang (A), bindet das 5'-Phosphat der DNA an einen Tyrosinrest des Flp-Monomers (B). Die Stränge werden neu verknüpft (C) und es entsteht eine Holliday-Übergangsstruktur (D). Der Vorgang wiederholt sich am anderen Strangpaar (E; verkürzt dargestellt) und ergibt das endgültige Rekombinationsprodukt.

und transgenen Mäusen eignet sich das System zur Deletion von DNA-Sequenzen (Dymecki, 1996). Analog zu Cre wurden durch Fusion mit dem Östrogenrezeptor auch von der Flp-Rekombinase regulierbare Varianten generiert (Logie und Stewart, 1995), welche die Generierung eines 'knockouts' zu einem bestimmten entwicklungsspezifischen Zeitpunkt ermöglichen.

Zwar wird das Cre/loxP-System aufgrund seiner früheren Einführung häufiger verwendet, der Vorteil des Flp/FRT-Systems ist jedoch, dass es im Gegensatz zu Cre/loxP mit keinem Patent belegt ist (Marshall, 1997) und so besonders für kommerzielle Anwendungen attraktiv ist. Insbesondere die Entwicklung einer weniger thermolabilen Variante der Flp-Rekombinase mit einem Temperaturoptimum von 37°C (Buchholz et al., 1998) macht dieses Rekombinationssystem zu einer Alternative zum Cre/loxP-System. Es konnte gezeigt werden, dass diese Flpe-Rekombinase ('Flp enhanced') in Mäusen maximale Aktivität besitzt (Rodriguez et al., 2000). Weiterhin ist, um verschiedene gezielte Modifikationen vornehmen zu können, die parallele Verwendung zweier Rekombinationssysteme nötig. So konnten durch Kombination des Cre/loxP- und des Flp/FRT-Systems aus einer Mauslinie drei unterschiedliche Allele des Fgf8-Locus generiert werden (Meyers et al., 1998).

Auch die Integration von Plasmiden in eine singuläre FRT-Site konnte in Säugerzellen gezeigt werden (O’Gorman et al., 1991). Für eine Erhöhung der Effizienz der Integrationsreaktion empfiehlt sich die Verwendung von Selektionsfallen (Schübeler et al., 1998). Durch die Etablierung von Spacer-Mutanten der FRT-Site, welche miteinander, nicht aber mit der Wildtyp-FRT-Site rekombinieren (Schlake und Bode, 1994), konnte ein Konzept zum Austausch von Genkassetten entwickelt werden (Seibler und Bode, 1997). Dieses als RMCE (‘recombinase-mediated cassette exchange’, siehe Abb. 2.13) bezeichnete Prinzip konnte bislang in Kulturzellen (Verhoeyen et al., 1998 und Seibler, 1999) und in ES-Zellen (Seibler et al., 1998) erfolgreich durchgeführt werden. Auch für das Cre/loxP-System wurden RMCE-Ansätze entwickelt. Diese beruhen aufgrund von Kreuzrekombination zwischen mutierten loxP-Sites auf der Verwendung identischer invertierter Rekombinaseerkennungstellen, um Exzisionen zu vermeiden (Feng et al., 1999). So liegen nach Austausch zwei Orientierungen der integrierten Kassette vor.

1.3 Aufgabenstellung

S/MAR-Elemente besitzen nicht nur strukturgebende Funktion bei der Organisation des eukaryontischen Chromatins, sondern nehmen auch Einfluss auf die Genexpression. In einer Vielzahl von Expressionsstudien wurde ein aktivierender Einfluss dieser Elemente nachgewiesen, jedoch ist ihr Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss von S/MAR-Elementen auf unterschiedliche Expressionsparameter analysiert werden, um Rückschlüsse auf ihre Funktionsweise ziehen zu können. Hierzu werden verschiedene Untersuchungssysteme genutzt. Zunächst wird ihr Einfluss auf die Expression eines Reportergens und eines Selektionsmarkers in Klongemischen zweier Zelllinien bestimmt. Diese Untersuchung dient der Bestätigung früherer Beobachtungen.

Da die Expressionseigenschaften eines Transgens entscheidend vom Integrationsort abhängen, kann eine genaue Beurteilung der Wirkung cis-agierender Elemente nur vor dem gleichen genomischen Hintergrund erfolgen. Zu diesem Zweck werden zwei unterschiedliche auf sequenzspezifischer Rekombination beruhende Konzepte genutzt. Mithilfe sequenzspezifischer Exzision durch die Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT werden schrittweise ein Reportergen flankierende S/MAR-Elemente entfernt, so dass ihr Einfluss auf Höhe und Stabilität der Expression im gleichen Integrationsort bestimmt werden kann. Die Analysen erfolgen in zwei verschiedenen Zelllinien und in mehreren genomischen Orten.

Im dritten Teil der Arbeit soll ein Untersuchungssystem entwickelt werden, welches den Vergleich von unterschiedlichen cis-agierenden Elementen und adäquaten Kontrollsequenzen im gleichen Integrationsort erlaubt. Durch Nutzung des auf dem Flp/FRT-Rekombinationssystem beruhenden Kassettenaustauschverfahrens sollen mit S/MAR-Elementen, Insulatoren und Kontrollelementen flankierte Reportergenkassetten in vorcharakterisierte Genloci der Zelllinie CHO K1 eingebracht und ihre Expressionseigenschaften verglichen werden. Zunächst wird der Einfluss dieser Sequenzen bezüglich Höhe und Stabilität der Expression in zufälligen singulären Integrationsorten analysiert. Durch den Vergleich der Varianz der Expressionshöhen von S/MAR- und Insulator-flankierten Konstrukten kann überprüft werden, ob die S/MAR-Elemente die Expressionskassette von Chromatineinflüssen abschirmen.

2. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung cis-agierender Elemente auf die Genexpression. Hierzu wurden verschiedene Ansätze genutzt. Um einen Hinweis auf die Eigenschaften von S/MAR-Elementen zu erhalten, sollte ihr Einfluss zunächst in Klongemischen untersucht werden. Dies diente der Verifizierung von Literaturangaben. Da der chromosomale Ort die Genexpression entscheidend beeinflusst, ist es sinnvoll, Expressionsanalysen in einer definierten genomischen Umgebung durchzuführen. Dieses sollte durch Verwendung zweier unterschiedlicher auf sequenzspezifischer Rekombination beruhender Systeme gewährleistet werden. Im zweiten Teil der Arbeit fand das Exzisionskonzept Verwendung, wobei zwei ein Reportergen flankierende S/MAR-Elemente sukzessiv entfernt werden. Im dritten Teil wurde ein auf RMCE ('recombinase-mediated cassette exchange') basierendes Konzept entwickelt, welches die Integration von zu analysierenden Genkassetten im gleichen genomischen Ort ermöglicht. In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss von S/MAR- und anderen cis-agierenden Elementen ebenfalls an Einzelklonen und Klongemischen untersucht.

2.1 Auswirkungen von S/MAR-Elementen auf die Expressionshöhe in Klongemischen

Im ersten Teil der Arbeit sollte die transkriptionssteigernde Wirkung zweier in unserer Arbeitsgruppe charakterisierter S/MAR-Elemente bestätigt werden. S/MAR-Elemente sind eine Gruppe von DNA-Sequenzen, welche stabil ins Genom integriert einen transkriptionsaktivierenden Einfluss ausüben können (Übersicht in Bode et al., 1998). Ob diese Transkriptionssteigerung auf einem Cis-Effekt, d.h. einem direkten Einfluss der Elemente auf die Transkriptionsinitiation, oder der Lenkung der Integration in Chromatinbereiche mit transkriptionsfördernden Eigenschaften ('Targeting'-Effekt) beruht, ist noch nicht geklärt und soll in Kap. 2.3 dieser Arbeit untersucht werden. Die größte Wirkung wird erzielt, wenn zwei S/MAR-Elemente ein Reportergen flankieren und somit eine „Minidomäne“ bilden (Klehr et al., 1991). Ein besonders starker Effekt zeigte sich in Klonen der Zelllinie CHO K1 ('chinese hamster ovary') mit ein und zwei Kopien eines Luziferase-Reportergens, in welchen die Anwesenheit zweier flankierender S/MAR-Elemente die Expression durchschnittlich um den

Faktor 26 erhöhte (Bode et al., 1998).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Konstrukten handelt es sich um die in Abb. 2.1 dargestellten Vektoren Lu, Elu und ELuW. Das Reporter-gen Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* befindet sich unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers. Das Genprodukt katalysiert die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin. Hierbei wird Lichtenergie frei, so dass die Enzymaktivität über die Lichtemission in Zellextrakten schnell und sensitiv bestimmt werden kann. Der Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase (*neo^r*) vermittelt Resistenz gegenüber der Selektionsdroge G418 und erlaubt so die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen.

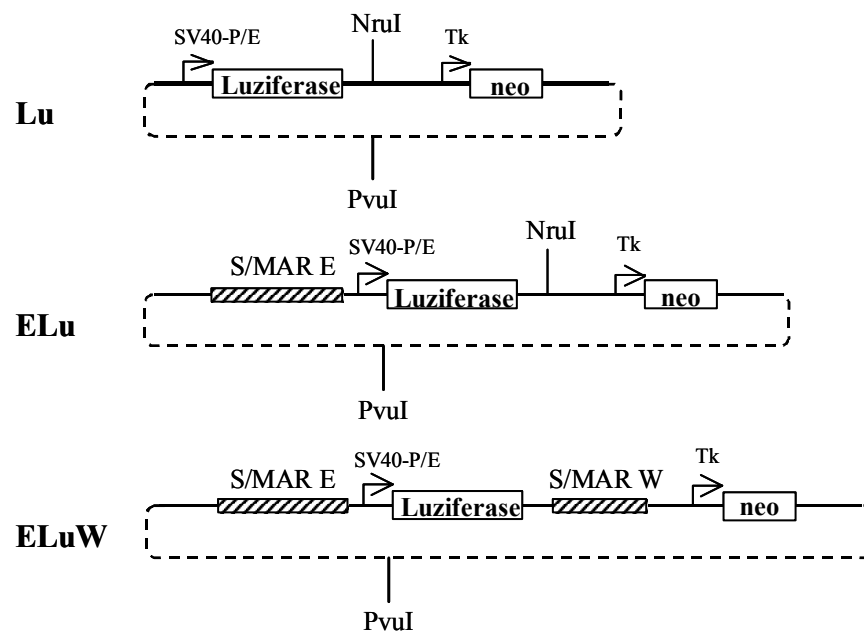


Abb. 2.1: Reporterkonstrukte zur Untersuchung der S/MAR-Wirkung auf die Gen-expression.

Das Luziferase-Reporter-gen wird vom SV40-Promotor/Enhancer aus transkribiert, das *neo^r*-Gen steht unter der Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors. Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung an. Die S/MAR-Elemente E und W sind als diagonal gestreifte Kästen dargestellt. Die gestrichelte Linie symbolisiert das prokaryontische Vektorrückgrat. PvuI und NruI sind die alternativen Linearisierungsschnittstellen vor Elektroporation.

Im Konstrukt Elu befindet sich 5' des Reporters das 2,2 kbp große S/MAR E aus dem 5'-Bereich des humanen β -Interferongens (Bode und Maaß, 1988). Das S/MAR E bindet *in vitro* unter Standardbedingungen zu 96% an Kernmatrixpräparationen (Fragment I in Mielke et al., 1990) und führt *in vivo* zur Steigerung der Expression benachbarter Reportergene (Mielke et al., 1990; Klehr et al., 1991). Im Konstrukt ELuW ist 3' des Luziferasegens zusätzlich das 1,3 kbp große S/MAR-Element W aus dem ersten Intron eines lichtinduzierten Gens aus der

Kartoffel inseriert, so dass eine sog. „Minidomäne“ nachgebildet ist. Das S/MAR W wirkt spezies-unabhängig. Es hat dem S/MAR E vergleichbare Matrix-Bindungseigenschaften und steigert ebenfalls die Genexpression in Säuger-Kulturzellen (Fragment X in Mielke et al., 1990).

Allerdings wurde in dieser Untersuchung das Luziferase-Reportergen vom Resistenzgen Neomycinphosphotransferase durch das S/MAR W räumlich getrennt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expressionserhöhung des Reporters auf eine Reduktion von Promotorinterferenzen zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, sollte die Wirkung der oben genannten S/MAR-Elemente auf die Expression des Reporters Luziferase nach unterschiedlicher Linearisierung der Reporterkonstrukte Lu und ELu untersucht werden. Das Enzym PvuI schneidet die Konstrukte im prokaryontischen Vektorrückgrat, während durch Linearisierung mit NruI Reporter- und Selektionsgen räumlich voneinander getrennt werden (Abb. 2.1). Falls nun die mit NruI linearisierten Konstrukte eine höhere Expression als die mit PvuI linearisierten aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die mit dem Konstrukt ELuW erreichte Expressionserhöhung nicht allein auf die cis-agierende Wirkung des S/MAR W zurückzuführen ist. Das Konstrukt ELuW kann mangels singulärer Restriktionsschnittstelle nicht zwischen den Expressionskassetten linearisiert werden.

Die unterschiedlich linearisierten Konstrukte Lu und ELu sowie das mit PvuI linearisierte Konstrukt ELuW wurden stabil in die Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 (Maus-Fibroblasten) transfiziert. Der Gentransfer erfolgte über Elektroporation, da durch diese Methode DNA in geringer Kopienzahl in Zellen eingebracht wird (Baer et al., 2000). Es wurden 4 µg von allen Konstrukten in CHO-K1-Zellen und 1,5 µg in NIH-3T3-Zellen elektroporiert, um den Einfluss der S/MAR-Elemente auf die Expression des Selektionsmarkers und des Reportergens zu untersuchen.

Abb. 2.2A und B zeigen die nach Selektion mit G418 erhaltenen relativen Klonzahlen als Maß für die Aktivität des *neo^r*-Gens in der Zelllinie CHO K1. Bei gleich linearisierten Konstrukten steigert das S/MAR E die Klonzahl um das vierfache. Die zusätzliche Anwesenheit des S/MAR W erhöht die Klonzahl nochmals um den Faktor 1,7 (Abb. 2.2 A). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf dem größeren Abstand zwischen Resistenz- und Reportergen durch das S/MAR W. Für das gleiche Konstrukt (Lu oder ELu) ergeben sich doppelt so hohe Klonzahlen bei räumlicher Trennung beider Gene durch Linearisierung mit NruI (vgl. Abb. 2.2A mit 2.2B). Die Bestimmung der Klonzahlen zeigt also, dass die S/MAR-

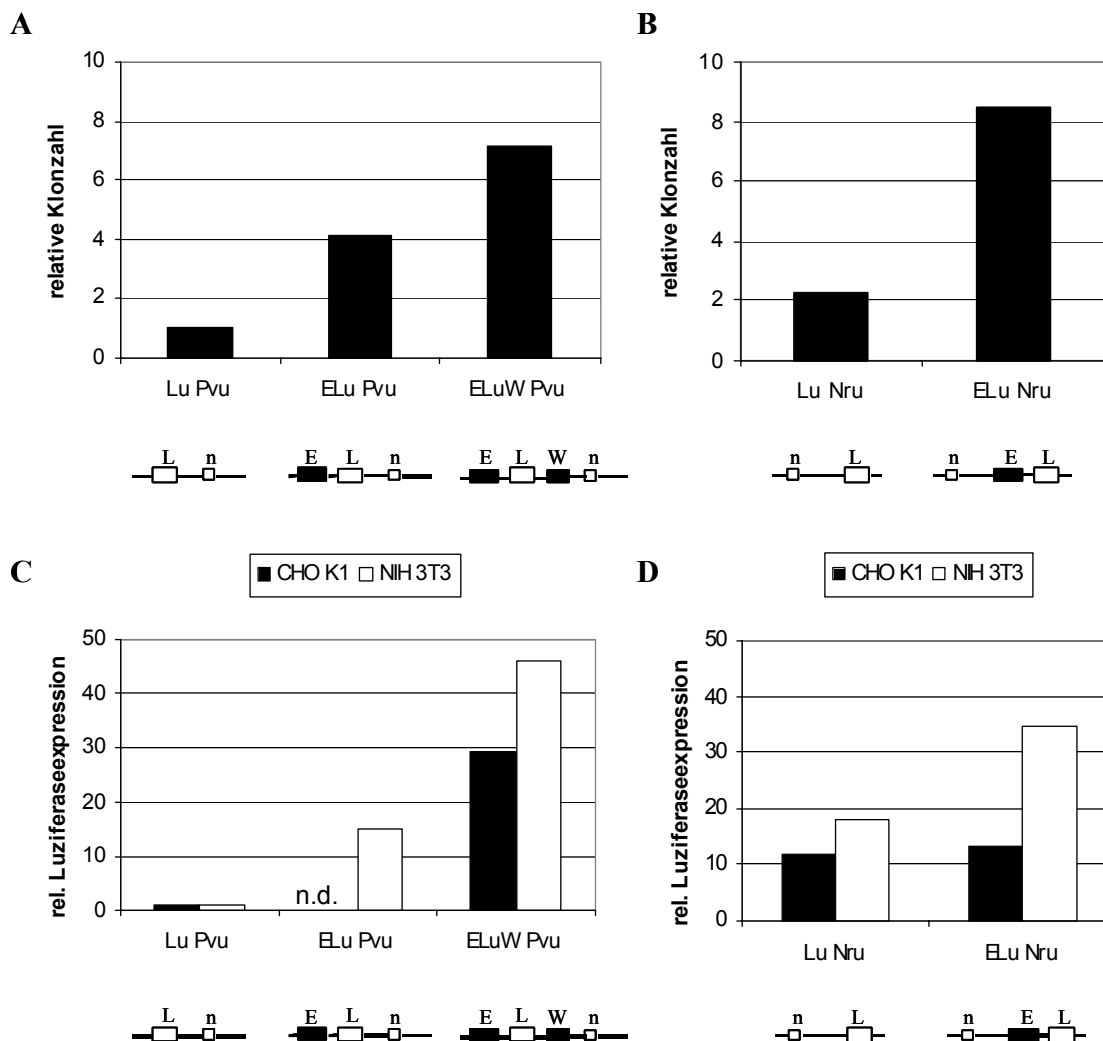


Abb. 2.2: Wirkung der S/MAR-Elemente auf die Expression des *neo^r*-Gens und des Luziferase-Reportergens.

A: Relative Klonzahlen nach Elektroporation der mit PvuI linearisierten Konstrukte in der Zelllinie CHO K1. B: Relative Klonzahlen nach Elektroporation der mit NruI linearisierten Konstrukte in der Zelllinie CHO K1. C: Relative Luziferaseexpression der Klongemische in den Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 nach Linearisierung mit PvuI. D: Relative Luziferaseexpression der Klongemische in den Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 nach Linearisierung mit PvuI.

Die schwarzen Balken symbolisieren die Expressionshöhe der Gemische in der Zelllinie CHO K1, die weißen Balken die Expressionshöhe der Gemische in der Zelllinie NIH 3T3. Angegeben ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen. Unterhalb der Diagramme sind schematisch die unterschiedlich linearisierten Konstrukte dargestellt. L=Luziferase-Gen, n=*neo^r*-Gen, E=S/MAR E, W=S/MAR W. n.d. = nicht durchgeführt.

Elemente einen positiven Einfluss auf die Expression des *neo^r*-Gens ausüben, wobei die Wirkung des S/MAR W möglicherweise auf einen Abstandseffekt zurückzuführen ist. Die Linearisierung mit NruI ist offensichtlich günstiger für die *neo^r*-Expression, da in diesem Fall

das gesamte prokaryontische Vektorrückgrat mit einer Länge von 2,8 kbp die beiden Transkriptionseinheiten voneinander abschirmt und somit Promotorinterferenzen reduziert werden.

Die relative Luziferaseexpression der Klongemische ist in Abb. 2.2C und D für die Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 dargestellt. Die Expression des CHO K1-Gemisches, welches durch Elektroporation von ELu PvuI linearisiert generiert wurde, konnte aufgrund einer Kontamination nicht gemessen werden. Insgesamt zeigt sich ein aktivierender Effekt der S/MAR-Elemente auf die Expressionshöhe des Reportergens. Betrachtet man die mit PvuI linearisierten Konstrukte, so steigert das S/MAR E die Expression in NIH 3T3-Zellen um den Faktor 15 im Vergleich zum S/MAR-freien Konstrukt, die Flankierung der Expressionseinheit mit beiden S/MAR-Elementen ergibt eine Expressionserhöhung um den Faktor 29 in CHO-K1-Zellen und um den Faktor 46 in NIH-3T3-Zellen (Abb. 2.2C). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Beobachtungen in Klongemischen (Klehr, 1991) und Einzelklonen (Bode et al., 1998). Die Linearisierung mit NruI hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Expression des Reporters, der in einem größeren Abstand der beiden Transkriptionseinheiten begründet sein kann (s.o.). In diesem Fall ist der Effekt des S/MAR E geringer als bei Linearisierung mit PvuI. Im Gegensatz zur Klonzahlbestimmung haben die Gemische, welche ELuW PvuI linearisiert enthalten, eine höhere Expression als die Gemische mit ELu NruI linearisiert. Dies lässt darauf schließen, dass das S/MAR W einen cis-agierenden Einfluss auf die Transkription des Luziferase-Gens ausübt und nicht nur der räumlichen Trennung der Expressionskassetten dient.

Insgesamt lassen sich durch die Expressionsanalysen in den Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 also die schon früher beobachteten positiven S/MAR-Effekte auf die Transkription bestätigen. Die Ansätze mit den unterschiedlich linearisierten Konstrukten zeigen allerdings, dass das Vorhandensein eines Reporters und eines Selektionsmarkers, deren Expressionen interferieren, die Deutung der gemessenen Effekte erschweren kann. Daher sollen für die in den folgenden Kapiteln anschließenden Expressionsstudien Fusionsgene verwendet werden. Da hier beide Funktionen auf einem Transkript liegen, wird eine Interferenz der Expressionen von Reportergen und Selektionsmarker umgangen.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Analyse von Klongemischen nur erste Hinweise auf die cis-agierende Wirkung der zu untersuchenden Elemente liefern kann. Es können keine Aussagen bezüglich Kopienzahl und Integrationsort getroffen werden, welche die Expression

entscheidend beeinflussen (siehe Kap. 2.2). Daher beruhen die im folgenden vorzustellenden Systeme zur Untersuchung cis-agierender Elemente auf der Verwendung von Einzelkopieklonen sowie der Expressionsanalyse vor dem gleichen genomischen Hintergrund.

2.2 Untersuchung der Wirkung von cis-agierenden Elementen auf die Genexpression unter Verwendung sequenzspezifischer Rekombination

Die in Kap. 2.1 vorgestellten Daten stehen in Einklang mit einer Vielzahl von Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass S/MAR-Elemente einen aktivierenden Einfluss auf die Expression eines Reportergens haben, insbesondere, wenn sie dieses flankieren (Klehr et al., 1991; Poljak et al., 1994; Kalos und Fournier, 1995; Stünkel et al., 2000).

Allerdings wurden frühere Analysen der Funktion von S/MAR-Elementen in Klongemischen und Einzelklonen nach zufälliger Integration der zu analysierenden Konstrukte durchgeführt. Hierbei wurden Kopienzahl und Anordnung (einzeln oder als Tandem-Integrate) der integrierten Konstrukte meist nur ungenau bestimmt. Es ist bekannt, dass Mehrfachintegrationen oft mit transkriptioneller Inaktivität des Konstrukts einhergehen (Kalos und Fournier, 1995), welche durch Methylierung (Lau et al., 1999) oder homologie-abhängige Inaktivierung (Garrick et al., 1998; Bingham, 1997) verursacht wird. Da die chromosomale Umgebung durch Wechselwirkung mit dem integrierten Konstrukt sowohl Höhe als auch Stabilität der Expression beeinflusst, wird so die Summe unterschiedlicher Effekte in verschiedenen unbekannten genomischen Loci gemessen. Daher können die durch Untersuchung von Klongemischen und Einzelklonen mit Mehrfachintegrationen erhaltenen Erkenntnisse nur als erste Hinweise auf den Einfluss der untersuchten Elemente betrachtet werden.

Für eine genauere und reproduzierbare Untersuchung der Wirkung cis-agierender Elemente auf die Expression empfiehlt sich somit die Studie von Einzelklonen mit einer singulären Kopie eines Reportergens. Nur so kann der gemessene Effekt der Wirkung des cis-agierenden Elements in einem bestimmten genomischen Kontext zugeordnet werden. Ideal ist die Analyse der Genexpression in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Elemente vor dem gleichen genomischen Hintergrund. Hierzu werden in dieser Arbeit zwei auf

sequenzspezifischer Rekombination beruhende Systeme Verwendung finden. Zunächst soll die Auswirkung des Entfernens von S/MAR-Elementen auf die Expression eines flankierten Reportergens untersucht werden.

2.2.1 Das Exzisionskonzept

In diesem Kapitel soll die Wirkung eines Subfragments des S/MAR-Elements E auf die Genexpression untersucht werden. Das in Abb. 2.3 dargestellte Exzisionskonzept erlaubt das sukzessive Entfernen zweier S/MAR-Elemente aus einem genomisch integrierten Reporter-genkonstrukt und somit die Analyse der Reporter-genexpression in An- und Abwesenheit der S/MAR-Elemente vor dem gleichen genomischen Hintergrund. Der Vektor 8SVbg8 enthält das Fusionsgen β geo (Friedrich und Soriano, 1991) unter der Kontrolle des SV40-

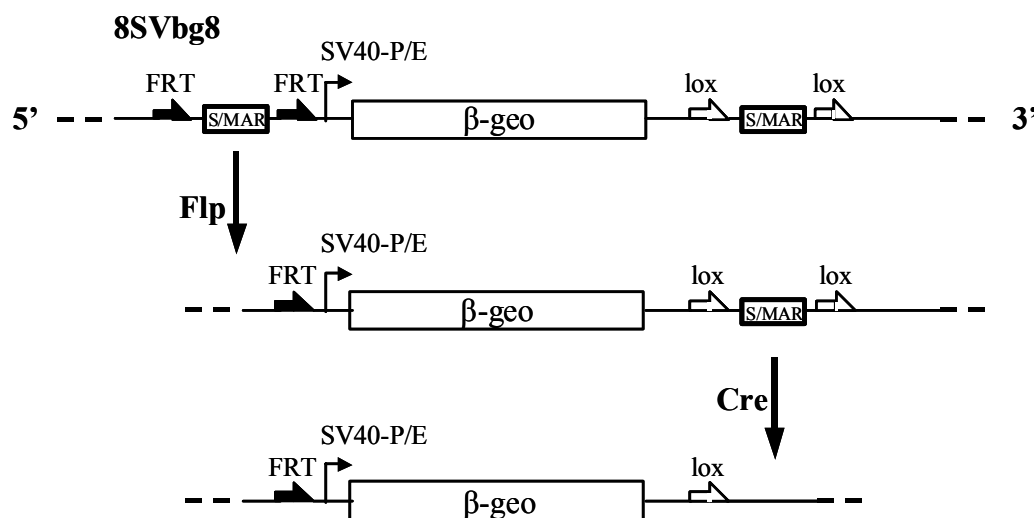


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Exzisionskonzeptes.

In der oberen Zeile ist der Vektor 8SVbg8 nach Linearisierung und Integration ins Genom schematisch abgebildet. Das Reportergen β -geo steht unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers und ist flankiert von zwei S/MAR800-Elementen. Das 5' des Gens gelegene S/MAR ist wiederum von zwei FRT-Sites, den Erkennungsstellen für die Flp-Rekombinase, eingefasst, welche als schwarze Halbpfeile dargestellt sind, das 3'-S/MAR von zwei loxP-Sites, den Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase, dargestellt als weiße Halbpfeile. Die gestrichelte Linie symbolisiert das zelluläre Genom. In Anwesenheit einer aktiven Flp-Rekombinase erfolgt die Exzision des 5'-S/MAR-Elements, eine aktive Cre-Rekombinase exzidiert das 3'-S/MAR-Element. Die Reihenfolge der Exzisionsschritte ist durch den Einsatz der Rekombinasen steuerbar.

Promotor/Enhancers. Es besteht aus dem *lacZ*-Gen aus *E.coli*, das für die bakterielle β -Galaktosidase kodiert und dem *neo^r*-Gen aus dem bakteriellen Transposon Tn5. Das vom *neo^r*-Gen kodierte Enzym Neomycinphosphotransferase vermittelt Resistenz gegen das Gentamycin-Derivat Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (G418), welches die Translation hemmt. Durch die Kopplung des Resistenzgens an den Reporter β -Galaktosidase wird sichergestellt, dass dieser in jeder resistenten Zelle exprimiert wird. Die β -Galaktosidase-Aktivität kann sowohl nach Zellaufschluss über einen sensitiven Fluoreszenz-Assay zur Quantifizierung der durchschnittlichen Expressionshöhe aller Zellen als auch intrazellulär zur Bestimmung der Reporter-gen-Aktivität einzelner Zellen nachgewiesen werden. Der Einzelzell-Expressionsnachweis kann durch FACS-Analyse oder Färbung der Zellen erfolgen und ermöglicht eine Bestimmung der Expressionsstabilität durch Ermittlung des Anteils exprimierender Zellen.

Die Expressionskassette ist eingerahmt von zwei gleich orientierten identischen S/MAR-Elementen aus dem 5'-Bereich des humanen β -Interferongens. Aus Gründen der Klonierbarkeit wurde hier ein 800 bp großes Subfragment des S/MAR-Elementes E verwendet (S/MAR800, Fragment IV in Mielke et al., 1990). Das S/MAR E bewirkte in Kap. 2.1 eine Expressionserhöhung des Luziferasegens. Das S/MAR800 zeigt *in vitro* 70% Bindung an Kernmatrixpräparationen (Kay und Bode, 1994) und führt *in vivo* zur Expressionserhöhung (Mielke et al., 1990, Schübeler et al., 1998). Das S/MAR800-Element 5' der Expressionskassette ist flankiert von zwei gleich orientierten FRT-Sites, während das 3' der Kassette befindliche S/MAR800-Element von zwei gleich orientierten loxP-Sites flankiert ist. Expression der Flp-Rekombinase ermöglicht die Exzision des 5' gelegenen Elements, Expression der Cre-Rekombinase führt zur Entfernung des 3'-Elements. Auf diese Weise ist es möglich, in Zellen, welche das Konstrukt 8SVbg8 stabil ins Genom integriert haben, selektiv das 5'-S/MAR, das 3'-S/MAR oder beide Elemente zu entfernen. So kann der Einfluss der Anwesenheit und der Position von S/MAR-Elementen auf die Höhe und Stabilität der Reporter-gen-Aktivität im gleichen genomischen Kontext untersucht werden. Durch die Flankierung der Kassette mit zwei identischen S/MAR-Elementen können Expressionsdifferenzen in unterschiedlich exzidierten Subklonen direkt auf die Positionierung und nicht auf die Sequenz der S/MAR-Elemente zurückgeführt werden.

In einer früheren Arbeit (Seibler, 1999) wurde mithilfe des Exzisionskonzepts ein aktivierender Einfluss des 3' gelegenen S/MAR800 auf die Transkriptionsinitiationsrate in der

Zelllinie CHO K1 ('chinese hamster ovary') in Abhängigkeit vom Integrationsort nachgewiesen. Allerdings konnte im Rahmen der oben genannten Arbeit die Auswirkung der Exzision des 5'S/MAR-Elements nicht mehr hinreichend untersucht werden. Daher sollten zur genaueren Untersuchung des cis-agierenden Einflusses des S/MAR800 im folgenden Exzisionsstudien in der Zelllinie CHO K1 vertieft und auch in einer Maus-Fibroblasten-Zelllinie (NIH 3T3) durchgeführt werden.

2.2.2 Untersuchung der cis-agierenden Wirkung des S/MAR800 in der Zelllinie CHO K1 mithilfe des Exzisionskonzepts

Im folgenden wurde der Einfluss der den Reporter β -geo flankierenden S/MAR-Elemente in der biotechnologisch relevanten Hamster-Zelllinie CHO K1 untersucht. Hierzu mussten zunächst CHO-K1-Einzelklone mit einer vollständigen Einzelkopie des Exzisionsvektors angelegt werden.

2.2.2.1 Generierung von CHO-K1-Einzelklonen mit singulärer Kopie des Vektors 8SVbg8

Da die Reporterexpression vor und nach Exzision der S/MAR-Elemente den Einfluss eines definierten genomischen Locus widerspiegeln sollte, war es notwendig, das Exzisionskonstrukt 8SVbg8 in singulärer Kopie in die Zellen einzubringen. Die Elektroporation hat sich für die Generierung von Klonen mit einem hohen Einzelkopieanteil als geeignet erwiesen (Baer et al., 2000). Für die Integration eines vollständigen und funktionellen Integrats mit definierten Enden wurde das Plasmid vor dem Gentransfer mit dem Enzym ScaI linearisiert, welches im *amp^r*-Gen im prokaryontischen Vektorrückgrat schneidet. Es wurden 1×10^6 CHO-K1-Zellen mit 10 μ g des linearisierten Konstrukts elektroporiert. Nach Selektion mit G418 und abgeschlossener Klonbildung wurden nach zwei Wochen 60 Einzelklone isoliert. Um Klone mit Integration einer singulären Kopie des Vektors zu identifizieren, wurde die genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym PvuII geschnitten. PvuII schneidet in 8SVbg8 viermal im β -geo-Gen.

Durch Verwendung einer gegen den 3'-Bereich des *neo*^r-Gens gerichteten DNA-Sonde können im Southern Blot Randfragmente nachgewiesen werden, welche für jeden genomischen Integrationsort eine bestimmte Größe haben, abhängig von der Entfernung der nächstgelegenen PvuII-Schnittstelle im Genom (siehe Abb. 2.4). Auf diese Weise wurden 53 unterschiedliche Klone untersucht, von denen elf ein singuläres Signal aufwiesen, welches zusätzlich durch Rehybridisierung mit einer Sonde aus dem SV40-Promotor bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da für die Exzisionsstudien nur Einzelkopieklone mit einer vollständigen Integration des Konstrukts verwendet werden konnten, wurden die generierten Klone mit singulärer Kopie im folgenden auf Intaktheit der Konstrukte untersucht.

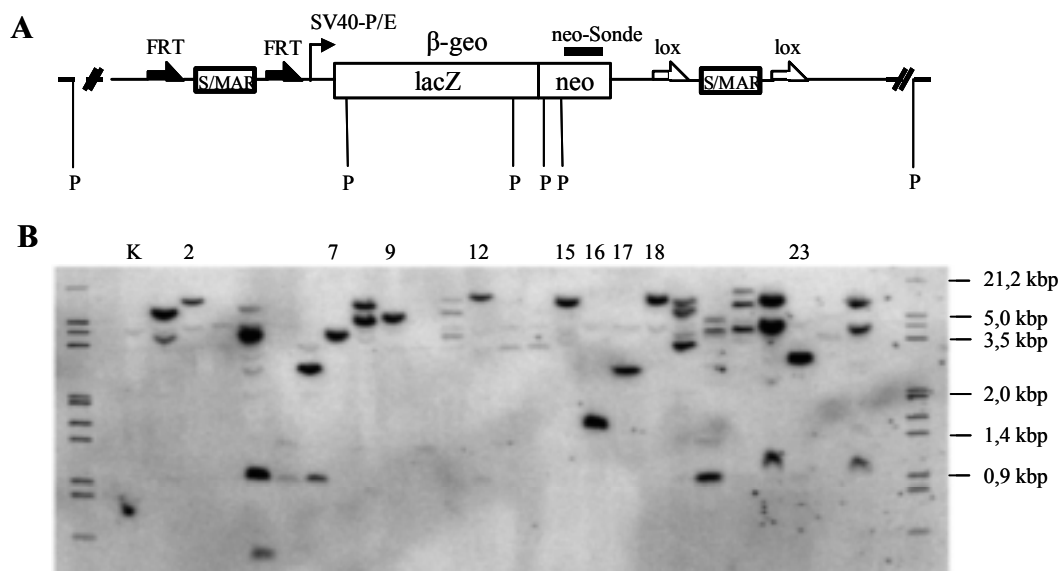


Abb. 2.4: Nachweis der Kopienzahl des Vektors 8SVbg8 in CHO-K1-Klonen durch Southern Blot Analyse nach Verdau der genomischen DNA mit PvuII.

A: Schema des Vektors nach Integration. P: Restriktionsschnittstelle für PvuII. Die zur Hybridisierung verwendete neo-Sonde ist als schwarzer Balken dargestellt.

B: Southern Blot nach Hybridisierung mit der neo-Sonde. Spuren mit nur einer Bande enthalten genomische DNA von Klonen mit singulärer Kopie des Vektors und sind mit Zahlen gekennzeichnet. K: Kontrollspur mit genomischer DNA von Wildtyp CHO-K1-Zellen. Marker: λ HindIII/EcoRI, S³⁵ markiert.

2.2.2.2 Feststellung der Vollständigkeit der integrierten Exzisionsvektoren in CHO-K1-Klonen mit singulärer Kopie

Durch zwei verschiedene Restriktionsanalysen wurde die Vollständigkeit der zu exzistierenden Konstrukte im Southern Blot untersucht. Das Enzym EcoRI schneidet viermal im Vektor 8SVbg8. Durch Hybridisierung mit einer S/MAR800-Sonde kann bei intakter Integration im 5'-Bereich ein 1,2 kbp großes Fragment nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.10A, S.41). Dies war bei acht der elf Einzelkopieklone der Fall (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der 3'-Intaktheit und der Vollständigkeit im mittleren Bereich des Konstrukts wurde die genomische DNA mit dem Enzym BamHI geschnitten. Bei Hybridisierung mit einer *lacZ*- und einer *neo*-Sonde treten bei Vollständigkeit eine 3,1 kbp große und eine 2,2 kbp große Bande auf (siehe Abb. 2.10C). Acht der elf Klone waren im 3'-Bereich intakt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt fünf Klone enthielten eine vollständige Integration des Exzisionsvektors und konnten für die anschließenden Exzisionsstudien verwendet werden.

2.2.2.3 Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente in CHO-K1-Klonen

Für die Exzision der die Reporterkassette flankierenden S/MAR-Elemente wurden die CHO-K1-Einzelkopieklone, welche ein vollständiges Integrat des Exzisionsvektors enthielten, mit Cre- bzw. Flp-Rekombinase kodierenden Plasmiden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation transfiziert. Da die Effizienz dieser Gentransfermethode insbesondere in CHO-Zellen relativ gering ist, sollten erfolgreich transfizierte Zellen zunächst angereichert werden. Dies ist möglich durch Verwendung Rekombinase-kodierender Plasmide, welche gleichzeitig den Fluoreszenz-Marker GFP ('green fluorescent protein') exprimieren. Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 489 nm eine Eigenfluoreszenz auf und lässt sich daher ohne Vorbehandlung im FACS sortieren. In jeder auf diese Weise sortierten GFP exprimierenden Zelle sollte auch die Rekombinase aktiv sein. Für die Exzision des von FRT-Sites flankierten 5'-S/MAR800-Elements wurden die Zellen mit dem Plasmid pFIG (Iber et al., 1999) transfiziert. In diesem Plasmid sind die Gene für die Flp-Rekombinase und für das GFP-Protein durch eine IRES ('internal ribosomal entry site') miteinander verbunden. Beide Gene werden von einer bicistronischen mRNA translatiert, da IRES-Elemente eine cap-

unabhängige Translationsinitiation vermitteln (Witherell und Wimmer, 1993). Das hier verwendete IRES stammt aus der 5' untranslatierten Region des Poliovirus (Dirks et al., 1993). Für einen BHK-Klon konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion mit pFIG eine Sortierung der GFP exprimierenden Zellen die Effizienz der Exzision eines von FRT-Sites flankierten DNA-Elements von 5% auf 95% erhöhte (Iber et al., 1999). Für die Exzision des 3' des Reporters gelegenen von loxP-Sites flankierten S/MAR800-Elements wurde das Plasmid pBS500 verwendet (Gagneten et al., 1997). In diesem Konstrukt steht ein Fusionsgen aus GFP und Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des EF1alpha-Promotors. Es wurden je 5µg der Plasmide pFIG und pBS500 in die fünf CHO-K1-Einzelklone transfiziert. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge pBS377 (Gagneten et al., 1997) transfiziert und sortiert. Dieses Plasmid enthält lediglich das GFP-Gen, angetrieben vom EF1alpha-Promotor, so dass es nicht zur Exzision eines der S/MAR-Elemente kommen kann.

Im folgenden wurden die 5'- und die 3'-Exzision zunächst unabhängig durchgeführt, in einem zweiten Schritt wurde danach an 3'-exzisierten Klonen zusätzlich das 5'-S/MAR-Element exzidiert. Bei Klon 40 wurden die 5'- und die 3'-Exzision in Parallelansätzen zweimal vorgenommen. Zur Überprüfung der Exzisionsereignisse wurde die genomische DNA der entstandenen Klone im Southern Blot analysiert. Zum Nachweis der Exzision des 5'-S/MARs wurde ein EcoRI-Verdau durchgeführt. Eine Hybridisierung mit einer 1200bp großen EcoRI-Sonde aus dem Vektor 8SVbg8 weist im nicht exzidierten Zustand das 1200bp-Fragment nach, welches einen großen Teil des 5'-S/MARs enthält. Nach erfolgter Exzision verschwindet das Signal. Als Kontrolle wurde der Blot parallel mit einer 650bp großen EcoRI-Sonde hybridisiert, welche ein DNA-Fragment gleicher Größe nachweist, das sowohl vor als auch nach der Exzision vorhanden sein sollte (Abb. 2.5A). Abb. 2.5B zeigt exemplarisch eine Southern Blot Analyse am Beispiel des Klons 32. Während alle Kontrollklone (K32), welche mit pBS377 transfiziert wurden, das 1,2 kbp Fragment aufwiesen, trat es bei vier von sieben Exzisionsklonen (E32) nicht mehr auf. Die Exzisionsrate des 5'-S/MARs beträgt bei allen Klonen zwischen 63% und 100% (Tab. 2.1), d.h. die Exzision verlief in allen Loci sehr effizient. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da es sich bei der Exzision um eine intramolekulare Reaktion handelt. Bei Klon 48 wiesen auch die Kontrollen die 1200 bp große Bande nicht mehr auf (nicht gezeigt), was möglicherweise auf unspezifische Deletionen zurückzuführen ist. Daher wurden die Exzisionsklone von Klon 48 in den Expressionsmessungen nicht berücksichtigt. In einigen der sortierten Klone traten

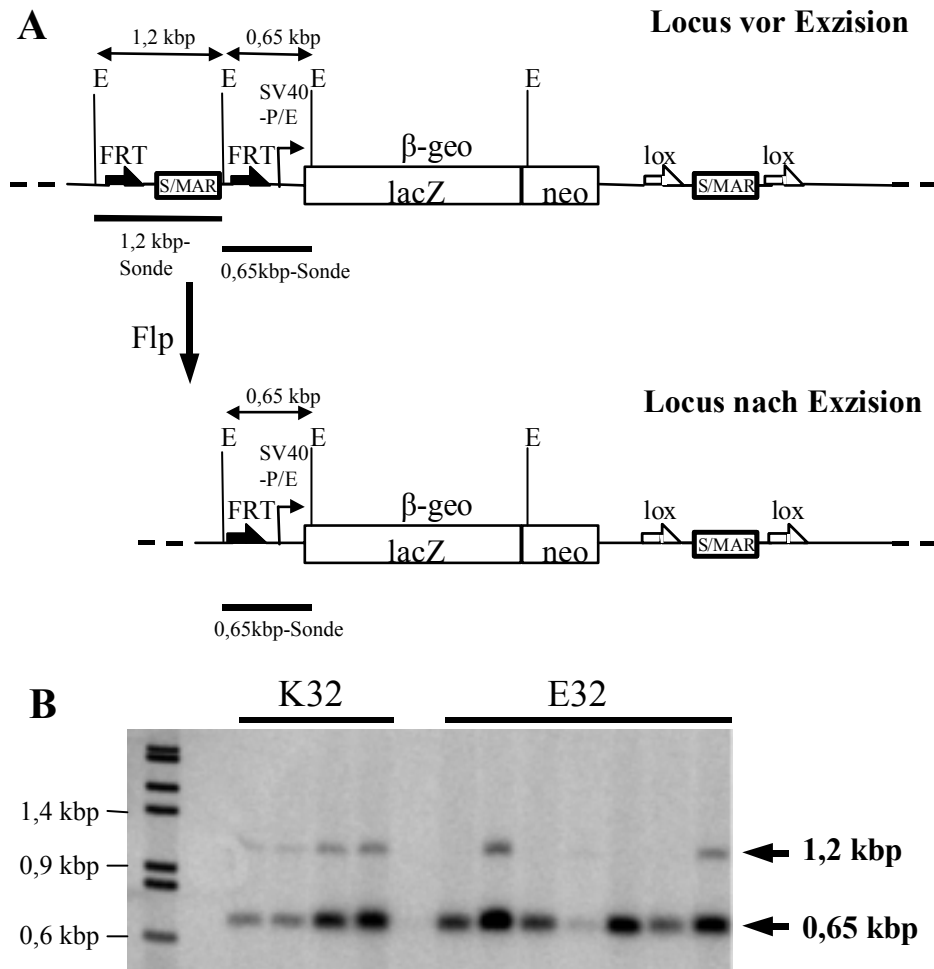


Abb. 2.5: Nachweis der 5'-Exzision im Southern Blot.

A: Schematische Darstellung der 5'-Exzision. Die genomische DNA der zu analysierenden Klon wurde mit EcoRI (E) geschnitten und mit einem 1,2 kbp sowie einem 0,65 kbp EcoRI-Fragment aus dem Vektor 8SVbg8 hybridisiert. Vor Exzision werden beide Fragmente nachgewiesen, nach Exzision des 5'-S/MAR800 durch die Flp-Rekombinase ist nur noch das 0,65 kbp große Fragment vorhanden. Die Sonden sind als schwarze Balken dargestellt.

B: Southern Blot Analyse am Beispiel des CHO-K1-Klons 32. Vier Kontrollklone, welche mit dem Vektor ohne Rekombinase transfiziert wurden (K32), weisen sowohl das 1,2 kbp als auch das 0,65 kbp Fragment auf. Von den mit pFIG transfizierten Klonen (E32) haben vier eine Exzision durchlaufen, während drei noch das 1,2 kbp Fragment besitzen. Marker: λ HindIII/EcoRI, S^{35} markiert.

Rearrangements des Parentalkonstrukts auf, welche sich als zusätzliche Banden im Southern Blot zeigten (nicht gezeigt).

Zum Nachweis der 3'-Exzision wurde die genomische DNA mit BamHI geschnitten und mit einem Fragment aus dem *neo'*-Gen hybridisiert. Abb. 2.6A zeigt schematisch, dass das zuvor 2,2 kbp große Fragment nach Exzision auf 1,2 kbp verkleinert wird. Für den Klon 37 ist

exemplarisch in Abb. 2.6B das Ergebnis einer solchen Southern Blot Analyse dargestellt. In Klon 32 fand keine Exzision statt. Dies ist möglicherweise auf eine Deletion einer loxP-Site zurückzuführen, welche durch die vorherige Vollständigkeitsüberprüfung nicht detektiert wurde. Dafür spricht, dass im Southern Blot die 2,2 kbp große Bande bei Klon 32 etwas niedriger läuft als bei den restlichen Klonen (nicht gezeigt). Diese zeigen Exzisionsraten zwischen 67% und 100% (Tab. 2.2), d.h. die 3'-Exzision verläuft ebenso effizient wie die 5'-Exzision. Die Unterschiede in der Effizienz der sequenzspezifischen Rekombination können durch unterschiedliche Zugänglichkeit des genomischen Locus für die Rekombinase erklärt werden. Von je einem Vertreter der 3' exzidierten Klone wurde zusätzlich die Exzision des 5'-S/MAR-Elements durchgeführt. Die Effizienz der Rekombinationsreaktion war im Vergleich zur 5'-Exzision der Ausgangsklone deutlich geringer (Tab. 2.3).

Ausgangsklon	exzidierte Klone	nicht exzidierte Klone	Rearrangements	Exzisionsrate
18	2	-	1	67%
32	5	3	-	63%
37	4	1	1	67%
40	9	-	-	100%

Tab. 2.1: Effizienz der 5'-Exzision in der Zelllinie CHO K1.

Die angegebenen Ausgangsklone wurden mit dem die FLP-Rekombinase kodierenden Plasmid pFIG transfiziert und die nach FACS-Sortierung entstandenen Subklone auf das Exzisionsereignis hin im Southern Blot untersucht. Die Exzisionsrate ergibt sich aus dem Anteil exzidiierter Klone an der Gesamtzahl der untersuchten Klone. Von Klon 40 wurden zwei Exzisionsansätze durchgeführt, die Exzisionsraten sind in der Tabelle zusammengefasst.

Ausgangsklon	exzidierte Klone	nicht exzidierte Klone	Rearrangements	Exzisionsrate
18	4	-	1	80%
32	-	5	-	0%
37	4	1	-	80%
40	6	3	-	67%
48	4	-	-	100%

Tab. 2.2: Effizienz der 3'-Exzision in der Zelllinie CHO K1.

Die angegebenen Ausgangsklone wurden mit dem die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid pBS500 transfiziert und die nach FACS-Sortierung entstandenen Subklone auf das Exzisionsereignis hin im Southern Blot untersucht. Die Exzisionsrate ergibt sich aus dem Anteil exzidiierter Klone an der Gesamtzahl der untersuchten Klone. Von Klon 40 wurden zwei Exzisionsansätze durchgeführt, die Exzisionsraten sind in der Tabelle zusammengefasst.

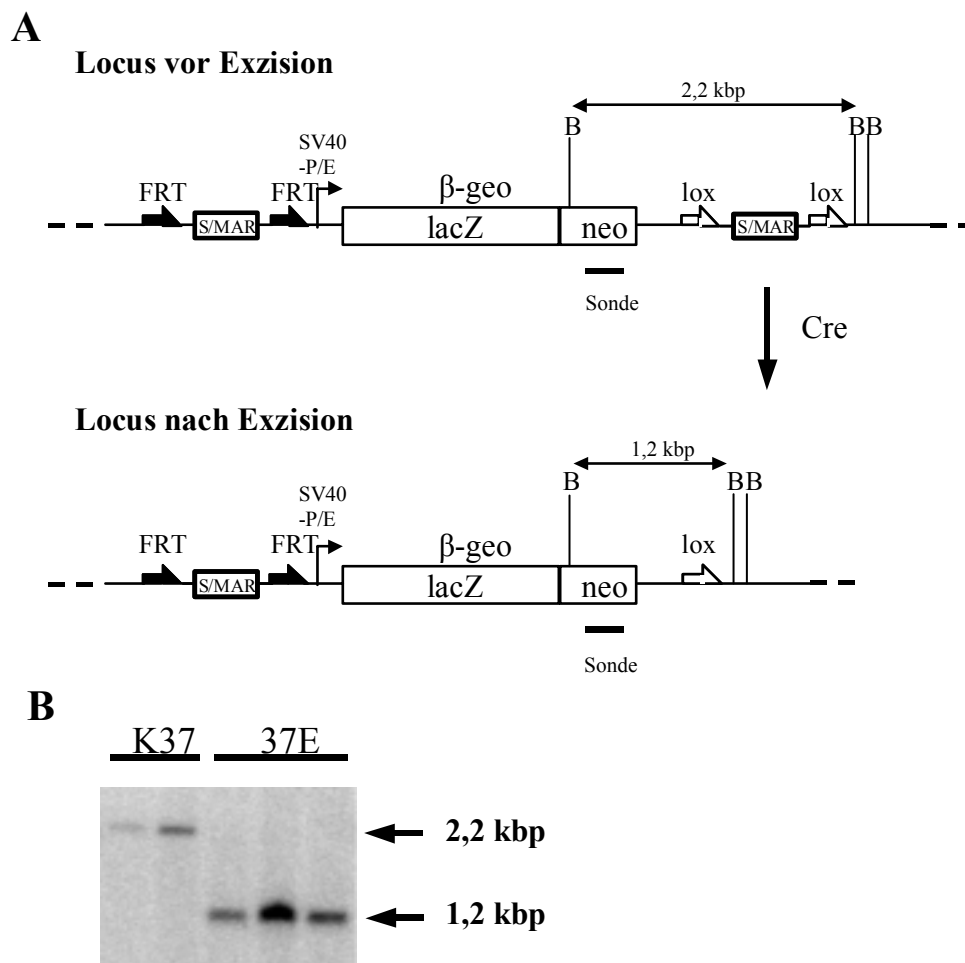


Abb. 2.6: Nachweis der 3'-Exzision im Southern Blot.

A: Schematische Darstellung der 3'-Exzision. Die genomische DNA der zu analysierenden Klone wurde mit BamHI (B) geschnitten und mit einem Fragment aus dem neo-Gen hybridisiert. Durch eine Exzision des 3'-S/MAR800 verringert sich die Distanz zwischen den Schnittstellen von 2,2 kbp auf 1,2 kbp.

B: Southern Blot Analyse am Beispiel des Klons 37. Das spezifische 1,2 kbp Fragment weisen alle mit der Cre-Rekombinase transfizierten Subklone (37E) auf. Die mit dem Vektor ohne Rekombinase transfizierten Klone (K37) zeigen hingegen keine Exzision und enthalten das 2,2 kbp Ausgangsfragment.

Klon	exziierte Klone	nicht exziierte Klone	Rearrangements	Exzisionsrate
18E1	1	4	1	17%
37E3	4	2	1	57%
40E1	2	4	2	25%
40E4	2	5	3	20%

Tab. 2.3: Effizienz der 5'-Exzision in 3' exziierten Klonen der Zelllinie CHO K1.

Die angegebenen 3' exziierten Klone wurden mit dem die Flp-Rekombinase kodierenden Plasmid pFIG transfiziert und die nach FACS-Sortierung entstandenen Subklone auf die Exzision des 5'-S/MAR-Elements hin im Southern Blot untersucht. Die Exzisionsrate ergibt sich aus dem Anteil exziiierter Klone an der Gesamtzahl der untersuchten Klone.

2.2.2.4 Expression der CHO-K1-Klone nach Exzision der S/MAR-Elemente

Cis-agierende Elemente können einen Einfluss auf die Höhe und Stabilität der Genexpression ausüben. Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit der S/MAR800-Elemente eine Auswirkung auf diese Expressionsparameter in den verschiedenen chromosomalen Integrationsorten hat. Zunächst wurde die Expressionshöhe der Ausgangsklone und der exzisierten Klone durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Hierzu wurde die Enzymaktivität des Zellextrakts nach Aufschluss mittels MUG-Assay festgestellt. Die im Zellüberstand befindliche β -Galaktosidase spaltet das unphysiologische Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid in Galaktose und 4-Methylumbelliferon, welches fluoresziert. Die Anregung des Produkts erfolgt bei einer Wellenlänge von 365 nm, die Emission wird bei 450 nm in 5minütigen Intervallen im Fluoreszenz-ELISA-Reader gemessen. Die Enzymaktivität ist im folgenden in ng β -Galaktosidase pro 1×10^6 Zellen angegeben.

Die Reportergenexpression nach Exzision des 5'- oder 3'-S/MAR800-Elements wurde in drei verschiedenen Integrationsorten an mindestens einem Ausgangs- und je zwei 5'- oder 3'-exzisierten Subklonen untersucht. Von Klon 40 wurden zwei Ausgangs- und die daraus resultierenden Exzisionsklone untersucht. Die Expressionshöhe ist in Abb. 2.7 angegeben. Es zeigte sich nach Exzision des 5'- oder des 3'-S/MAR-Elements eine vom Integrationsort abhängige Erhöhung oder Erniedrigung der Expressionshöhe. Bei Klon 18 führt die Exzision des 5'-S/MAR800 zu einer leichten Expressionserhöhung und die Exzision des 3'-S/MAR800 zu einer Verdopplung der Expressionshöhe (Abb. 2.7A). Bei Klon 37 hingegen verursacht die Exzision eines S/MAR-Elements eine leichte Erniedrigung der Expression (Abb. 2.7B) und bei Klon 40 kommt es zu einer deutlichen Expressionserniedrigung (Abb. 2.7C). In diesem Integrationsort wurde die Exzision parallel ein zweites Mal durchgeführt. Hier zeigen die exzisierten Subklone eine schwächere Expressionserniedrigung (Abb. 2.7D). Gründe hierfür sollen im Rahmen der Diskussion erörtert werden.

Der nach Exzision eines Elements untersuchte Einfluss des S/MAR800 auf die Höhe der Expression kann also je nach Integrationsort aktivierend oder reprimierend sein, unabhängig davon, ob das 3'- oder das 5'-flankierende Element entfernt wurde. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Wirkung die zusätzliche Exzision des zweiten S/MAR-Elements auf die Expression hat.

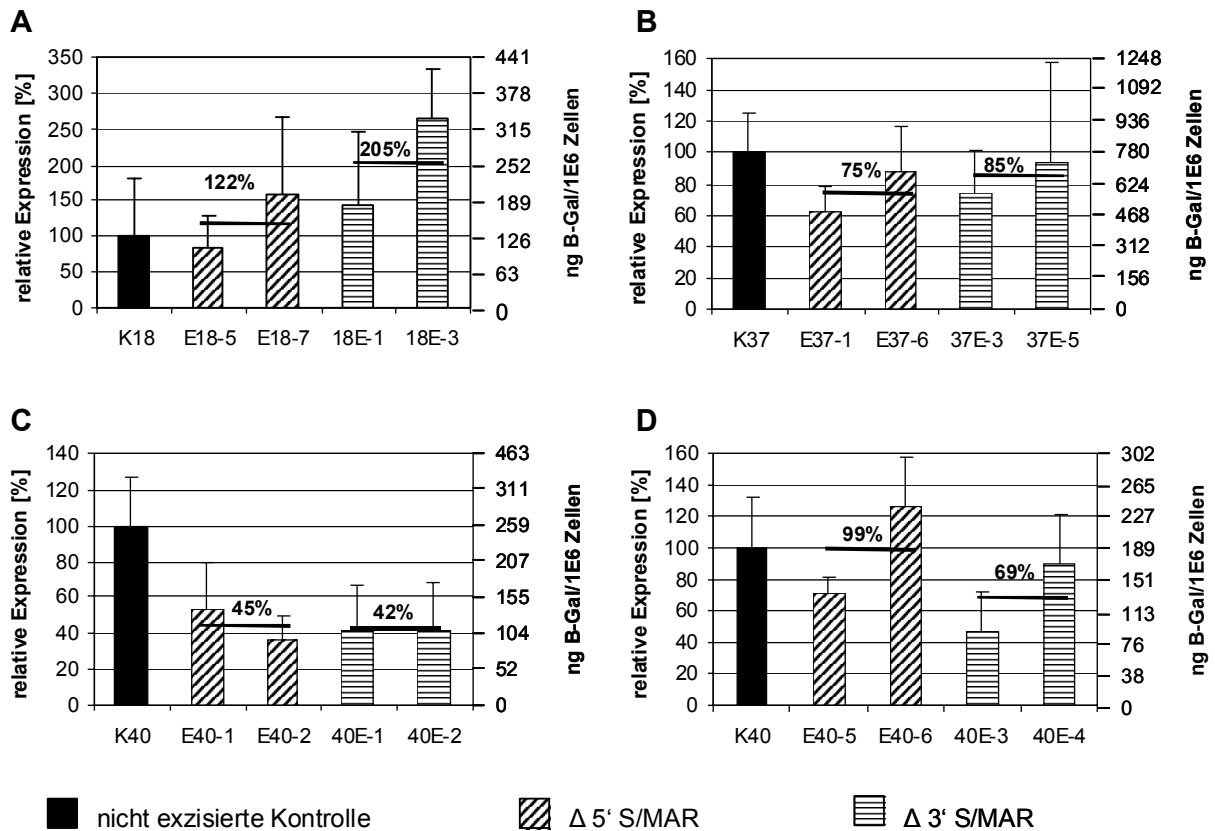


Abb. 2.7: Expressionshöhe von CHO-K1-Klonen vor und nach Exzision des 5'- oder des 3'-S/MAR800.

Auf der linken Achse ist die relative β -Galaktosidase-Expression als Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen angegeben. Hierbei wurde die Expression des nicht exziierten Kontrollklons auf 100% normiert. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt. Die schwarzen Querbalken geben den Mittelwert der relativen Expression der jeweiligen Exzisionsklone wieder. An der rechten Achse ist die Menge exprimierter β -Galaktosidase pro 1×10^6 Zellen abzulesen. Die schwarzen Balken symbolisieren die Expression der nicht exziierten Kontrollklone, welche mit dem Plasmid pBS377 transfiziert wurden, die diagonal gestreiften die der 5' exziierten Klone und die quer gestreiften die der 3' exziierten Klone.

Abb. 2.8 zeigt die Expressionshöhe von Klonen nach Exzision beider S/MAR-Elemente im Vergleich mit nur 3' exziierten Klonen. Auch hier wird ein vom Integrationsort abhängiger Einfluss des 5'-S/MAR-Elements deutlich. Die von den Klonen 40E-1 und 40E-4 generierten Subklone zeigen nach Exzision des 5'-S/MAR800 eine reproduzierbare zusätzliche starke Erniedrigung der Expressionshöhe auf durchschnittlich 9% bzw. 12% der Expressionshöhe der Kontrollklone mit 5'-S/MAR. Hier zeigt sich ein deutlicher additiver Effekt der S/MAR-Elemente. Die Subklone von Klon 18E-1 und 37E-3 hingegen weisen große Expressionsunterschiede auf. Bei Klon 18E-1 führt die Exzision des zweiten S/MAR-Elements in einem

Subklon zu einer weiteren starken Expressionserhöhung, während sie in dem zweiten Subklon keinen Effekt hat. Die Subklone von Klon 37E-3 zeigen Erhöhung, Erniedrigung und Gleichbleiben der Expression nach der zweiten Exzision. Die großen Expressionsunterschiede der genetisch identischen Subklone sind unerwartet. Auf mögliche Gründe hierfür soll im Rahmen der Diskussion eingegangen werden.

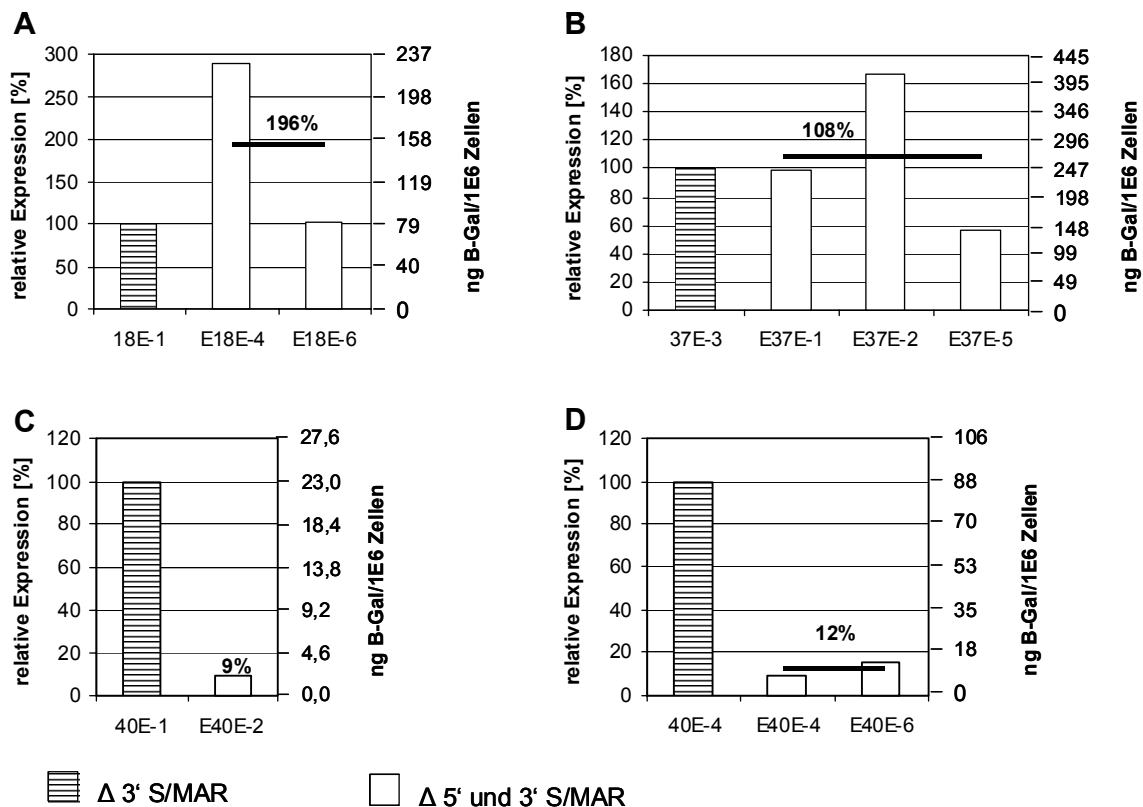


Abb. 2.8: Expressionshöhe nach Exzision beider S/MAR800-Elemente im Vergleich zu 3' exzisierten CHO-K1-Klonen.

Auf der linken Achse ist die relative β -Galaktosidase-Expression angegeben. Hierbei wurde die Expression des 3' exzisierten Kontrollklons auf 100% normiert. Die schwarzen Querbalken geben den Mittelwert der relativen Expression der Exzisionsklone wieder. An der rechten Achse ist die Menge exprimierter β -Galaktosidase pro 1×10^6 Zellen abzulesen. Die quer gestreiften Balken symbolisieren die Expressionshöhe der 3' exzisierten Kontrollklone, die mit dem Plasmid pBS377 transfiziert wurden, und die weißen Balken die der doppelt exzisierten Klone.

Da cis-agierende Elemente wie Enhancer einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Reportergenexpression ausüben (Walters et al., 1996), sollte im folgenden überprüft werden, ob das Entfernen eines der S/MAR-Elemente die Langzeitstabilität der β -Galaktosidase-Expression beeinflusst. Durch die Kopplung von Selektions- und Reporterfunktion im Fusionsgen β -geo exprimieren alle resistenten Zellen auch β -Galaktosidase. Ein Abschalten

der Reporteraktivität einzelner Zellen kann also nur ohne Selektion auf *neo*-Resistenz untersucht werden. Hierzu wurden die Klone mit Exzision eines S/MAR-Elements und die Kontrollklone über acht Wochen parallel in An- und Abwesenheit der Selektionsdroge G418 kultiviert und in regelmäßigen Abständen mit dem Farbstoff X-Gal angefärbt. Dieser wird im Cytoplasma von der β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, so dass Zellen, die das Reportergen exprimieren, im Lichtmikroskop als blau zu erkennen sind, während Zellen, welche die Expression verloren haben, ungefärbt/weiß bleiben. Der Grad der Inaktivierung wird durch den Anteil weißer zu blauer Zellen widerspiegelt. Nach achtwöchiger Kultivierung zeigte nur der Klon 40E-2 aus Abb. 2.7C, bei dem das 3'-S/MAR exzidiert ist, eine deutliche Inaktivierung der β -Galaktosidase-Expression. Bei Kultivierung ohne Selektionsdruck waren hier nur noch 5% aller Zellen blau gefärbt, während in Anwesenheit von G418 noch 80% der Zellen den Reporter exprimierten (Abb. 2.9). Die Expression der restlichen Klone war sowohl vor als auch nach der Exzision eines flankierenden S/MAR-Elements stabil.

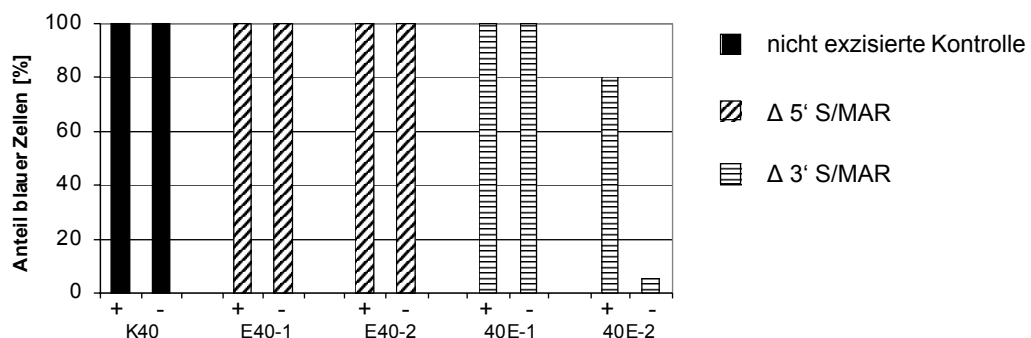


Abb. 2.9: Langzeitstabilität eines CHO-K1-Klons vor und nach Exzision des 5'- oder des 3'-S/MAR800.

Die Klone wurden acht Wochen lang mit (+) und ohne (-) Selektionsdruck kultiviert. Dargestellt ist der Anteil β -Galaktosidase-exprimierender Zellen. Die schwarzen Balken symbolisieren den nicht exzidierten Kontrollklon, die diagonal gestreiften die 5' exzidierten Klone und die quer gestreiften die 3' exzidierten Klone.

Die Exzisionsstudien zeigen, dass in CHO-K1-Zellen die Präsenz der flankierenden S/MAR800-Elemente einen stark vom Integrationsort abhängigen Einfluss auf die Expression des Reporters β -geo hat. Hierbei kann die Expression nach Entfernung eines oder beider S/MAR-Elemente erhöht oder erniedrigt sein. Die Position der S/MAR-Elemente hat in diesem System keinen Einfluss, da sich Subklone mit 5'- oder 3'-Exzision ähnlich verhalten. Eine nachfolgende Entfernung des zweiten S/MAR-Elements führte in einem Integrationsort

zu einer weiteren starken Erniedrigung der Expressionshöhe. Auch die Langzeitstabilität der Expression wurde durch Entfernung eines S/MAR800-Elements in diesem Integrationsort in einem Subklon beeinflusst. Anzumerken ist ebenfalls, dass die Rekombinationsrate bei der zweiten Exzision in Klonen, die schon das 3'-S/MAR verloren hatten, im Vergleich zur Exzisionsrate in den Ausgangsklonen deutlich reduziert war (siehe Tab. 2.6, S.45). Dies deutet darauf hin, dass die Entfernung des ersten S/MAR-Elements die Chromatinstruktur des genomischen Locus verändert, was möglicherweise eine reduzierte Zugänglichkeit für die Rekombinase in der zweiten Exzision zur Folge hat.

Um zu überprüfen, ob die nachgewiesenen S/MAR-Effekte typisch für die verwendete CHO-K1-Zelllinie sind, wurden die Exzisionsstudien zum Vergleich in der Mauszelllinie NIH 3T3 durchgeführt.

2.2.3 Untersuchung der cis-agierenden Wirkung des S/MAR800 in der Zelllinie NIH 3T3 mithilfe des Exzisionskonzepts

Analog zu den Versuchen in der Hamsterzelllinie CHO K1 mussten auch in der Mauszelllinie NIH 3T3 zunächst Einzelklone mit singulärer intakter Kopie des Exzisionsvektors angelegt werden, da nur so der Einfluss der Präsenz flankierender S/MAR-Elemente vor einem definierten genomischen Hintergrund untersucht werden kann (siehe 2.2.2.1).

2.2.3.1 Generierung von NIH-3T3-Einzelklonen mit singulärer Kopie des Vektors 8SVbg8

Ebenso wie in CHO-K1-Zellen wurde in NIH-3T3-Zellen der Exzisionsvektor durch Elektroporation transferiert. Nach Elektroporation von 1×10^6 Zellen mit 10 µg ScaI-linearisierten Konstrukts und Selektion mit G418 wurden nach abgeschlossener Klonbildung nach 2 Wochen 76 Einzelklone isoliert. Eine Kopienzahlbestimmung im Southern Blot analog zu Kap. 2.2.2.1 ergab, dass 28 von 55 untersuchten NIH-3T3-Klonen eine singuläre Kopie des Konstrukts 8SVbg8 enthielten (Daten nicht gezeigt), deren Intaktheit nachfolgend untersucht wurde.

2.2.3.2 Feststellung der Vollständigkeit der integrierten Exzisionsvektoren in NIH 3T3-Klonen mit singulärer Kopie

Vor der Exzision der die Reporterkassette flankierenden S/MAR800-Elemente musste auch in den NIH-3T3-Einzelkopieklonen das Vorhandensein dieser Elemente sowie der benachbarten Rekombinase-Sites sichergestellt werden. Die Integrität im 5'-Bereich wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben durch EcoRI-Schnitt und Hybridisierung mit einer S/MAR800-Sonde nachgewiesen (Abb. 2.10 A und B). Die intakten Klone zeigen im Southern Blot eine spezifische 1,2 kbp große Bande sowie ein Randfragment, welches durch Hybridisierung gegen das 3'-S/MAR-Element entsteht. Neun von 21 untersuchten Klonen mit singulärer Kopie des Exzisionsvektors waren im 5'-Bereich vollständig. Im 3'- und im mittleren Bereich wurde die Integrität des Konstrukts durch BamHI-Schnitt und Hybridisierung mit einer *lacZ*- und einer *neo*-Sonde nachgewiesen (Kap. 2.2.2.2 und Abb. 2.10 C und D). Hier waren 14 von 27 untersuchten Klonen intakt. In beiden Randbereichen vollständig waren allerdings nur zwei der 28 Einzelkopieklone, dies entspricht einer Rate von 7%. Die beiden Klone mit intakter singulärer Kopie des Exzisionsvektors wurden für die nachfolgenden Exzisionsexperimente verwendet.

2.2.3.3 Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente in NIH-3T3-Klonen

Bei den NIH-3T3-Klonen 4 und 15, welche eine intakte Einzelkopie des Exzisionsvektors enthielten, sollten die das Reportergen β -*geo* flankierenden S/MAR800-Elemente sequenzspezifisch entfernt werden. Hierzu wurden die Klone mit den in Kap. 2.2.2.3 vorgestellten Rekombinase-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Nach FACS-Sortierung GFP-exprimierender Zellen wurden die generierten Klone im Southern Blot wie unter 2.2.2.3 beschrieben auf das Exzisionsereignis hin untersucht. Zunächst wurden die Klone mit dem die FLP-Rekombinase exprimierenden Plasmid pFIG transfiziert. Die von Klon 4 generierten Subklone waren zu 100% 5' exzisiert, während bei Klon 15 die Exzisionsrate nur 40% betrug (Tab. 2.4).

Zur 3'-Exzision wurden die Klone 4 und 15 sowie die 5' exzisierten Klone E4-1 und E15-2 mit dem die Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid pBS500 transfiziert. Die Exzisionsrate betrug bei den Klonen 4 und E4-1 jeweils 100% (Tab. 2.5). Von den Klonen 15

und E15-2 konnten nach FACS-Sortierung keine Klone generiert werden. Auch eine zweite Transfektion von Klon 15 mit pBS500 mit anschließender FACS-Sortierung führte trotz Expression des Fusionsproteins aus GFP und Rekombinase nicht zur Klonbildung.

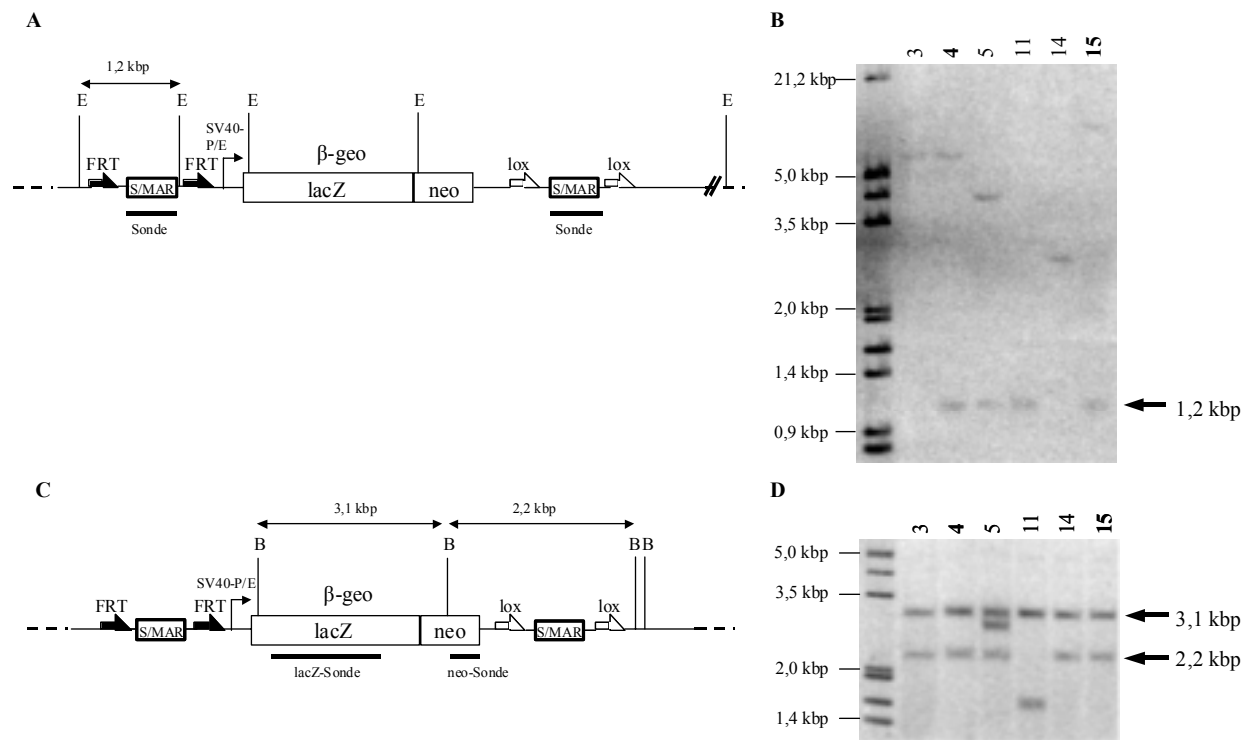


Abb. 2.10: Nachweis der Intaktheit von NIH-3T3-Klonen mit singularärer Integration von 8SVbg8 im Southern Blot.

A: Schematische Darstellung des Nachweises der 5'-Intaktheit. Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* (E) und Hybridisierung mit einer S/MAR800-Sonde ergibt ein spezifisches 1,2 kbp Fragment, welches die äußere FRT-Site einschließt. Zusätzlich wird, da die Sonde auch gegen das 3'-S/MAR800 hybridisiert, ein 3'-Randfragment nachgewiesen. Die chromosomale Umgebung wird durch die gestrichelte Linie symbolisiert.

B: Southern Blot Analyse von NIH-3T3-Einzelkopieklonen. Die Klone 4, 5, 11 und 15 weisen das 1,2 kbp Fragment auf und sind damit im 5'-Bereich intakt. Dick gedruckt sind die Klone 4 und 15, welche im weiteren für die Exzisionsstudien verwendet wurden. Marker: λ HindIII/*EcoRI*, S^{35} markiert.

C: Schematische Darstellung des Nachweises der 3'-Intaktheit. Verdau der genomischen DNA mit *BamHI* (B) und gleichzeitige Hybridisierung mit einer neo- und einer lacZ-Sonde ergibt ein 2,2 kbp großes Fragment, welches einen intakten 3'-Bereich anzeigt, sowie ein 3,1 kbp großes Fragment aus dem Fusionsgen.

D: Southern Blot Analyse von NIH-3T3-Einzelkopieklonen. Die Klone 3, 4, 14 und 15 weisen sowohl das 2,2 kbp als auch das 3,1 kbp Fragment auf und sind damit im 3'- und im mittleren Bereich intakt. Dick gedruckt sind die Klone 4 und 15, welche im weiteren für die Exzisionsstudien verwendet wurden. Marker: λ HindIII/*EcoRI*, S^{35} markiert.

Ausgangsklon	exziierte Klone	nicht exz. Klone	Rearrangements	Exzisionsrate
4	6	-	-	100%
15	2	1	2	40%

Tab. 2.4: Effizienz der 5'-Exzision in der Zelllinie NIH 3T3.

Die angegebenen Ausgangsklone wurden mit dem die F_lp-Rekombinase kodierenden Plasmid pFIG transfiziert und die nach FACS-Sortierung entstandenen Subklone auf das Exzisionsereignis hin im Southern Blot untersucht. Die Exzisionsrate ergibt sich aus dem Anteil exzistierter Klone an der Gesamtzahl der untersuchten Klone.

Ausgangsklon	exziierte Klone	nicht exz. Klone	Rearrangements	Exzisionsrate
4	6	-	-	100%
E4-1	4	-	-	100%

Tab. 2.5: Effizienz der 3'-Exzision in der Zelllinie NIH 3T3.

Die angegebenen Ausgangsklone wurden mit dem die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid pBS500 transfiziert und die nach FACS-Sortierung entstandenen Subklone auf das Exzisionsereignis hin im Southern Blot untersucht. Die Exzisionsrate ergibt sich aus dem Anteil exzistierter Klone an der Gesamtzahl der untersuchten Klone. Bei dem Klon E4-1 ist das 5'-S/MAR bereits exziiert.

2.2.3.4 Expression der NIH-3T3-Klone nach Exzision der S/MAR-Elemente

Zur Bestimmung des Einflusses von S/MAR-Elementen auf die Reportergenexpression wurde die β -Galaktosidase-Aktivität der exziierten Klone mit der der Ausgangsklone verglichen. Die Expressionshöhe wurde wie in Kap. 2.2.2.4 beschrieben mittels MUG-Assay bestimmt. In Klon 4 hat die Exzision eines der S/MAR800-Elemente einen leicht aktivierenden Einfluss auf die Transkriptionsrate (Abb. 2.11). Nach Exzision des 5'-S/MARs erhöht sich die Expression um durchschnittlich 33%, nach Exzision des 3'-S/MARs um 21%. Nach Exzision beider S/MAR800-Elemente erhöht sich die Expression durchschnittlich um 97%. Bei den doppelt exziierten Subklonen schwankt die Expression stark, was auch in einigen Integrationsorten in CHO-K1-Zellen beobachtet wurde. Die Expression des doppelt exziierten Klons E4E-2 beträgt ein Vierfaches der Expression des Ausgangsklons, während die Expression der anderen Subklone mit Doppellexzision deutlich niedriger ist. Mögliche Gründe hierfür sollen im Rahmen der Diskussion erörtert werden. Bei Klon 15 bewirkt die Exzision des 5'-S/MAR-Elements einen deutlichen Abfall der Transkriptionshöhe auf ein Drittel des Ausgangswertes. Um die Wirkung von S/MAR-Elementen in diesem Integrationsort genauer zu bestimmen, müssten auch 3' und doppelt exziierte Subklone

untersucht werden. Dies war jedoch aufgrund technischer Schwierigkeiten (s.o.) nicht möglich.

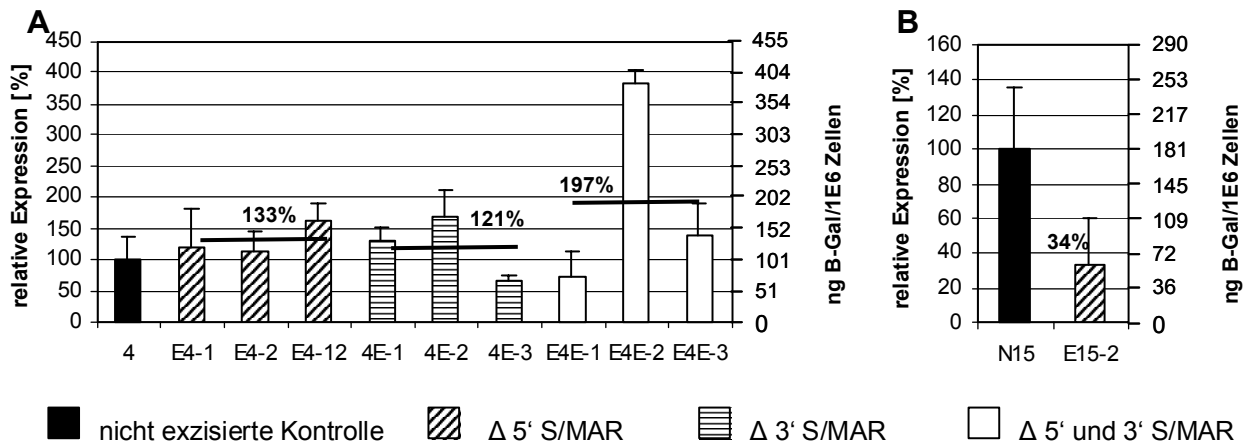


Abb. 2.11: Expressionshöhe der NIH-3T3-Klone 4 und 15 vor und nach Exzision der S/MAR800-Elemente.

Auf der linken Achse ist die relative β -Galaktosidase-Expression als Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen angegeben. Hierbei wurde die Expression des nicht exzisierten Kontrollklons auf 100% normiert. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt. Die schwarzen Querbalken geben den Mittelwert der relativen Expression der jeweiligen Exzisionsklone wieder. An der rechten Achse ist die Menge exprimierter β -Galaktosidase pro 1×10^6 Zellen abzulesen. Die schwarzen Balken symbolisieren die Expression der nicht exzisierten Kontrollklone, die diagonal gestreiften die der 5' exzisierten Klone, die quer gestreiften die der 3' exzisierten Klone und die weißen die der 5' und 3' exzisierten Klone.

Im folgenden sollte ermittelt werden, ob auch die Stabilität der Expression von der Anwesenheit der S/MAR-Elemente abhängt. Hierzu wurden die NIH-3T3-Klone über einen Zeitraum von mehreren Wochen parallel in An- und Abwesenheit von Selektionsdruck kultiviert. Durch die Kopplung von Reporter- und Selektionsfunktion im Fusionsgen β -geo können nur in Abwesenheit von G418 Zellen überleben, die die Expression verloren haben. Eine X-Gal-Färbung weist diese Zellen als ungefärbt/weiß nach, während die exprimierenden Zellen blau gefärbt werden (siehe Kap. 2.2.2.4). Nach Kultivierung über 17 Passagen ohne Selektionsdruck zeigten je ein Klon der einfach und zwei der doppelt exzisierten Subklone einen Verlust der Expression (Abb. 2.12). Von den Klonen E4-12, 4E-2 und E4E-1 hatten zu diesem Zeitpunkt 40% bis 60% der Zellen die Expression verloren, vom Klon E4E-3 5%. Die parallel unter Selektionsdruck gehaltenen Klone waren zu 100% blau gefärbt. Offensichtlich hat die Präsenz der S/MAR800-Elemente in diesem Integrationsort eine expressions-

stabilisierende Wirkung. Bei Klon E15-2 hingegen fand keine Inaktivierung statt (Daten nicht gezeigt). In NIH-3T3-Zellen fördert also die Anwesenheit der S/MAR-Elemente die Stabilität der Expression. Die Wirkung auf die Expressionshöhe ist in Abhängigkeit vom Integrationsort aktivierend oder reprimierend.

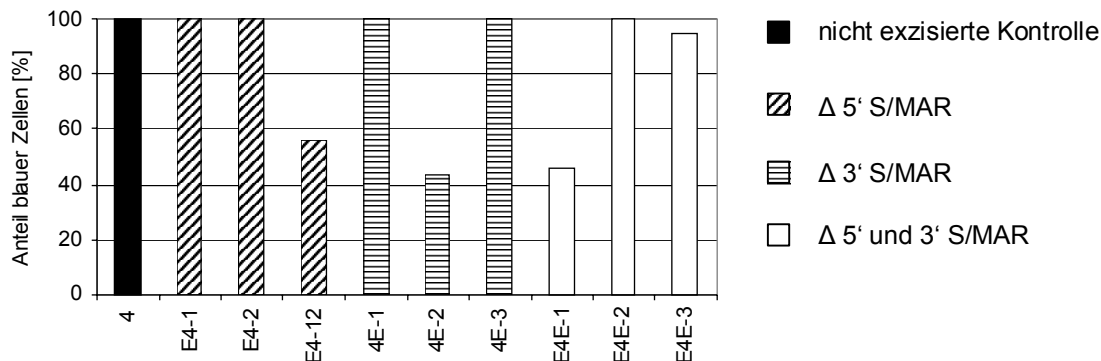


Abb. 2.12: Langzeitstabilität der Expression des Klons 4 vor und nach Exzision der S/MAR-Elemente.

Dargestellt ist der Anteil β -Galaktosidase exprimierender Zellen nach Kultivierung in Abwesenheit von G418 über 17 Passagen. Die schwarzen Balken symbolisieren die nicht exzidierten Ausgangsklone, die diagonal gestreiften die 5' exzidierten Klone, die quer gestreiften die 3' exzidierten und die weißen die doppelt exzidierten.

Die in den zwei verschiedenen Zelllinien durch die Exzisionsanalysen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Wirkung des S/MAR800 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

In der Zelllinie CHO K1 wurden die Expressionsparameter Höhe und Stabilität in drei verschiedenen Integrationsorten untersucht. Hier führte die Exzision eines S/MAR-Elements in zwei Loci durchschnittlich zu einer Absenkung der Expression, während im dritten Locus die Expression erhöht wurde (Abb. 2.7). Die zusätzliche Exzision des zweiten S/MARs führte in einem Locus zu einer weiteren Expressionserniedrigung, in den anderen beiden schwankte die Expression zwischen den Subklonen stark (Abb. 2.8), wobei es in dem Integrationsort, in dem die erste Exzision eine Expressionserhöhung bewirkt hatte, zu einer weiteren deutlichen Erhöhung der durchschnittlichen Expression der Subklone kam.

In NIH-3T3-Zellen ist die S/MAR-Wirkung ebenfalls vom Integrationsort abhängig. Während in einem der zwei untersuchten Loci die Expressionshöhe sich nach Exzision eines S/MAR-Elements geringfügig erhöhte, schwankte nach Entfernen beider flankierender Elemente die Expression der genetisch identischen Subklone stark und erhöhte sich nochmals im

Durchschnitt. In dem zweiten untersuchten Locus kam es nach Entfernen eines S/MAR800-Elements zu einer starken Expressionserniedrigung. Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit eines oder beider S/MAR-Elemente die Reporterkassette von aktivierenden und reprimierenden Einflüssen der genomischen Umgebung abschirmt. Die S/MAR-Wirkung ist additiv, da in den meisten Integrationsorten die nach Exzision eines Elements beobachtete Wirkung auf die Expressionshöhe nach Exzision des verbliebenen Elements weiter verstärkt wurde. Die Stabilität der β -Galaktosidase-Expression wird ebenfalls von der Präsenz der S/MAR800-Elemente beeinflusst. In NIH-3T3-Zellen kam es im Integrationsort 4 in vier von neun einfach oder doppelt exzidierten Klonen zu einem Verlust der Expression einzelner Zellen, wobei die Wahrscheinlichkeit des Expressionsverlusts größer bei Klonen ohne S/MAR-Element ist. Dieser auch als ‘Silencing’ bezeichnete Effekt kann auf reprimierende Einflüsse des umgebenden Chromatins zurückgeführt werden, vor welchen die flankierenden S/MAR-Elemente das Reportergen in diesem Integrationsort offensichtlich schützen. Es lässt sich also auch hier feststellen, dass die Wirkung der S/MAR800-Elemente additiv ist, d.h. der cis-agierende Effekt ist am deutlichsten, wenn sie die Genkassette flankieren.

Weiterhin ist anzumerken, dass in CHO-K1-Klonen, in denen das 3'-S/MAR800 bereits entfernt war, die Zugänglichkeit des Locus für die Flp-Rekombinase deutlich herabgesetzt war (Tab. 2.6). Dies spricht ebenfalls für eine Chromatin „öffnende“ Wirkung von S/MAR-Elementen.

Ausgangsklon	Exzisionsrate der 5' Exzision	Exzisionsrate der 5' Exzision nach 3' Exzision
18	67%	17%
37	67%	57%
40	100%	25% 20%

Tab. 2.6: Vergleich der Effizienz der 5'-Exzision vor und nach erfolgter 3'-Exzision in der Zelllinie CHO K1.

Die Exzisionsraten wurden den Tabellen 2.1 und 2.3 entnommen. Sie geben den Anteil exzidierter an der Gesamtzahl der hinsichtlich des Exzisionsereignisses analysierten Klone wieder. Bei Klon 40 wurde die 5'-Exzision an zwei unabhängigen 3' exzidierten Subklonen vorgenommen.

Das Exzisionskonzept erlaubt eine genauere Analyse der S/MAR-Wirkung auf die Genexpression als die in der Vergangenheit an Klongemischen und Einzelklonen

durchgeführten Expressionsstudien, da der Einfluss des S/MAR-Elements auf die Transgenexpression vor dem gleichen genomischen Hintergrund im direkten Vergleich zu S/MAR-freien Konstrukten untersucht werden kann. Die Exzision der die Expressionskassette flankierenden S/MAR-Elemente konnte in den meisten Integrationsorten effizient durchgeführt werden. Durch Langzeitkultivierung wurde erstmalig eine expressionsstabilisierende Wirkung des S/MAR800 nachgewiesen. Die Analysen der Expressionshöhe vor und nach Exzision der S/MAR800-Elemente zeigten, dass deren Wirkung deutlich vom Integrationsort abhängig ist. Das S/MAR800 hat nicht in jedem Kontext eine transkriptionsfördernde Funktion. In einigen Loci kam es nach Exzision eines S/MAR-Elements zur Expressionserniedrigung, in anderen zur Expressionserhöhung. Dieser Effekt wurde in den meisten Fällen durch Exzision des verbliebenen Elements noch weiter verstärkt, d.h. die S/MAR-Wirkung ist synergistisch. Für diese Beobachtungen gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Es ist denkbar, dass S/MARs mit weiteren am Integrationsort vorhandenen positiv oder negativ regulatorischen Sequenzen interagieren und daher je nach Kontext unterschiedlich wirken. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die S/MAR800-Elemente die Expressionskassette sowohl von reprimierenden als auch von aktivierenden Einflüssen des benachbarten Chromatins abschirmen. So sollte die Expressionskassette nach Exzision der flankierenden S/MAR-Elemente diesen Einflüssen stärker ausgesetzt sein. Diese Eigenschaft wurde bei einer weiteren Klasse cis-agierender Elemente, den Insulatoren, beobachtet (Übersicht in Bell und Felsenfeld, 1999). Daher soll im folgenden Teil dieser Arbeit die Wirkung von S/MARs direkt mit der von Insulatoren verglichen werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die S/MAR-Elemente nur eine räumlich abschirmende Wirkung auf die Expressionskassette ausüben und keinen Cis-Effekt wie die Insulatoren. Um dies auszuschließen, müssten neben Insulatoren auch nicht Matrix-bindende Kontrollsequenzen im gleichen Integrationsort wie S/MARs untersucht werden.

Das Exzisionskonzept ermöglicht das Entfernen von Elementen, nicht aber deren Integration in einen charakterisierten genomischen Ort. Aus diesen Gründen sollte im folgenden ein weiteres ebenfalls auf sequenzspezifischer Rekombination beruhendes System zur Untersuchung der Wirkung von S/MAR-Elementen auf die Genexpression entwickelt werden, welches die Integration von zu untersuchenden Sequenzen erlaubt. Mit diesem System sollte es möglich sein, S/MAR-haltige, Insulator-haltige und Kontroll-Expressionskassetten genomisch zu verankern und in einem zweiten Schritt gegeneinander auszutauschen.

2.3 Untersuchung von cis-agierenden Elementen durch Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch

Mit dem bisher beschriebenen Exzisionsverfahren können DNA-Abschnitte in charakterisierten Loci effizient entfernt werden. Die Exzision der S/MAR800-Elemente hat eine vom Integrationsort abhängige aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Genexpression. Dies lässt vermuten, dass S/MARs ein flankiertes Transgen vom umliegenden Chromatin abschirmen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, soll die Wirkung von S/MAR-Elementen auf die Transgenexpression mit der von Insulatoren sowohl in zufälligen Loci als auch vor dem gleichen genomischen Hintergrund verglichen werden. Letzteres erfordert die Einbringung der zu untersuchenden cis-agierenden Sequenzen in einen definierten genomischen Locus. Die Umkehrung der Exzisionsreaktion, also die Integration von DNA-Sequenzen in einen mit einer singulären Erkennungsstelle für Rekombinasen markierten genomischen Ort, bringt jedoch folgende Nachteile mit sich: Da es sich bei der Integration um eine bimolekulare Reaktion handelt, liegt das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Exzision, welche eine monomolekulare Reaktion ist (Baer und Bode, 2001). Zudem ist für die Integration der gleichzeitige Transfer der gewünschten DNA-Sequenz und eines Selektionsmarkers erforderlich. Um die spezifische Integration gegenüber der zufälligen anzureichern, empfiehlt sich die Anwendung einer Selektionsfalle (O’Gorman et al., 1991; Schübeler et al., 1998). Jedoch erschwert die Anwesenheit eines exprimierten Selektionsmarkers die Untersuchung cis-agierender Elemente, da dieser möglicherweise die zu analysierende Reportergenexpression beeinflusst. Weiterhin wird bei der Integration eines Plasmids über eine singuläre Rekombinaseerkennungsstelle nicht nur die gewünschte DNA-Sequenz sondern auch das prokaryontische Plasmidrückgrat eingebracht, welches ebenfalls einen nicht vorhersagbaren Einfluss auf die Expression des Reporters haben kann. Aus diesen Gründen soll zur weiteren Untersuchung cis-agierender Elemente ein System genutzt werden, welches eine effiziente marker- und vektorfreie Integration von DNA-Sequenzen erlaubt. Dieses auf zwei sequenzspezifischen Rekombinationen beruhende Verfahren wird als RMCE (‘recombinase-mediated cassette exchange; Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch) bezeichnet (Übersicht in Baer und Bode, 2001). Das auf der Flp-Rekombinase basierende System wurde erstmals von Schlake und Bode (1994) vorgestellt. Mittlerweile ist auch ein Cre-vermittelter Kassettenaustausch beschrieben worden (Bouhassira et al., 1997).

In Abb. 2.13 ist der Flp-vermittelte Kassettenaustausch schematisch dargestellt. Das RMCE-Konzept beruht auf Flankierung einer Expressionskassette mit zwei unterschiedlichen, sich in ihrer Spacer-Sequenz unterscheidenden, FRT-Sites. In der Spacer-Region, welche die Orientierung der FRT-Site bestimmt, findet die homologe Paarung während der Rekombination statt (siehe Kap. 1.2.2). Durch systematische Mutation der Spacer-Sequenz konnten mutierte FRT-Sites generiert werden, welche nicht mehr mit der wt-FRT-Site rekombinieren (Schlake und Bode, 1994). Die Rekombination mit einer gleichermaßen mutierten FRT-Site ist allerdings genauso effizient wie die Rekombination zwischen zwei wt-FRT-Sites (Schlake und Bode, 1994). So kann die im Genom verankerte DNA-Sequenz,

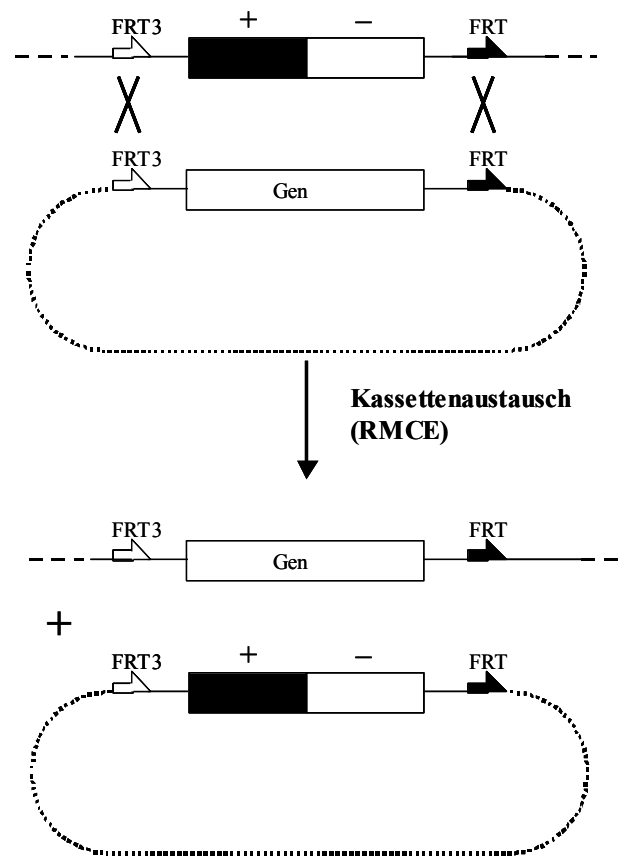


Abb. 2.13: Schematische Darstellung des Flp-RMCE ('recombinase-mediated cassette exchange').

Ein genomisch integrierter Positiv/Negativ-Selektionsmarker wird von zwei sich in ihrer Spacer-Sequenz unterscheidenden inkompatiblen FRT-Sites flankiert. Dieser Marker kann gegen ein von dem gleichen Satz an FRT-Sites flankiertes Gen auf einem transfizierten Plasmid ausgetauscht werden. Die Reaktion wird von der Flp-Rekombinase katalysiert. Der Austausch kann prinzipiell sowohl durch Positivselektion auf das eingebrachte Gen (siehe Text) als auch durch Negativselektion auf den Verlust des Negativselektionsmarkers angereichert werden. Der weiße Halbpfeil symbolisiert die Mutante 3 der FRT-Site (FRT3 oder F3), der schwarze die Wildtyp-FRT-Site (FRT oder F).

welche sich zwischen den heterospezifischen FRT-Sites befindet, gegen eine auf einem Austauschplasmid gelegene Sequenz ausgetauscht werden. Diese muss von den gleichen Sites flankiert sein. Eine Integration unerwünschter Vektorsequenzen findet hierbei nicht statt.

Um unspezifische Integrationsereignisse weitestgehend zu vermeiden, muss der Austausch angereichert werden. Der Austausch einer Sequenz gegen einen Positiv-Selektionsmarker ist nur bei Verwendung sogenannter Selektionsfallen ('promoter-traps') effizient (Schübeler et al., 1998; Verhoeyen et al., 1998). Eine Anreicherungsstrategie ohne Einbringung eines exprimierten Positiv-Selektionsmarkers ist in Abb. 2.13 dargestellt. Hier wird der Verlust eines genomisch verankerten Positiv-/Negativselektionsmarkers, wie z.B. des *hyg^r*-Fusionsgens, über Negativselektion angereichert. Da ein exprimierter Selektionsmarker die Untersuchung der Reportergenexpression beeinträchtigen kann, bietet sich für die Analyse der Wirkung cis-agierender Sequenzen die Anreicherung des Austauschereignisses über Negativselektion an. Daher soll ein auf RMCE basierendes Konzept zur Untersuchung verschiedener cis-agierender Sequenzen vor dem gleichen genomischen Hintergrund entwickelt werden.

2.3.1 Konzept zur vergleichenden Analyse der cis-agierenden Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren

Das im folgenden vorzustellende System ermöglicht die Untersuchung cis-agierender Elemente in zwei Stufen. Um einen ersten Hinweis bezüglich ihrer Wirkung auf die Expressionseigenschaften eines Reportergens zu erhalten, sollten zunächst Expressionsstudien in Einzelkopieklonen durchgeführt werden. In einem zweiten Schritt kann anschließend die im Genom verankerte Kassette gegen eine zweite mit anderen flankierenden Elementen ausgetauscht werden. Bei den zu untersuchenden flankierenden Elementen handelt es sich um S/MAR-Elemente, Kontrollelemente gleicher Größe ('Spacer') und Insulatoren. Letztere sind ebenso wie S/MARs an den Grenzen von Gendomanen lokalisiert und schirmen Gene innerhalb der Domäne von den Einflüssen des umliegenden Chromatins ab (Übersicht in Bell und Felsenfeld, 1999 sowie Bell et al., 2001). In der Vergangenheit wurde diese Eigenschaft auch bei einigen S/MAR-Elementen nachgewiesen (Stief et al., 1989; Kalos und Fournier, 1995; Namciu et al., 1998). Daher sollten in diesem System die cis-agierenden Eigenschaften

von S/MARs und Insulatoren miteinander verglichen werden.

Zunächst werden die Parentalkonstrukte beschrieben, welche verschiedene ein Transgen flankierende Sequenzen enthalten und zur Anlage der Einzelkopieklone genutzt wurden. Nach Charakterisierung der Expressionseigenschaften sollten diese Konstrukte mittels RMCE gegen Genkassetten mit anderen zu vergleichenden flankierenden Elementen ausgetauscht werden.

Die Parentalkonstrukte basieren auf dem Grundkonstrukt F3SGTNF (Abb. 2.14A), welches folgende Eigenschaften besitzt: Unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers steht das Fusionsgen GTN (Unsinger, eingereicht). Hierbei handelt es sich um eine Dreifachfusion aus dem Reportergen eGFP ('enhanced green fluorescent protein'), dem Negativ-Selektionsmarker Thymidinkinase sowie dem Positiv-Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase. Das *neo^r*-Gen vermittelt Resistenz gegenüber der Selektionsdroge G418 und erlaubt so die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen. Der Reporter eGFP dient der Bestimmung der Expressionseigenschaften der integrierten Genkassette. Da das Genprodukt intrazellulär in einzelnen Zellen mittels FACS-Analyse nachgewiesen wird, kann sowohl Höhe als auch Stabilität der Expression untersucht werden. Bei dem eGFP-Gen handelt es sich um eine FACS-optimierte Mutante des aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden GFP-Gens, welche bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 489 nm eine 20- bis 35-fach höhere Fluoreszenzintensität besitzt. Der Negativ-Selektionsmarker Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus verleiht Zellen Sensitivität gegenüber Ganciclovir, welches durch Phosphorylierung in ein toxisches Produkt umgesetzt wird. Diese Negativselektion ermöglicht die Anreicherung des Austauschzustandes nach RMCE. Die Funktionalität des Fusionsgens wurde in CHO-Zellen in stabilen Klongemischen und Einzelklonen überprüft (Daten nicht gezeigt). Das Fusionstranskript wird an einer Polyadenylierungssequenz terminiert, die aus dem Gen für das bovine Wachstumshormon stammt (Soriano, P., Seattle; pRC/CMV, Invitrogen, US-Patent-Nr.: 5,122,458). Die korrekte Größe der mRNA des Fusionsgens konnte mittels Northern Blot Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Expressionskassette ist flankiert von zwei heterospezifischen FRT-Sites, über welche sie durch sequenzspezifische Rekombination ausgetauscht werden kann. 5' des Promotors befindet sich eine mutierte Site (F3), 3' des Poly(A)-Signals die Wildtyp-Site. Diese Kombination von FRT-Sites wurde in der Vergangenheit erfolgreich für RMCE verwendet (Seibler und Bode, 1997; Seibler et al., 1998) und es konnte gezeigt werden, dass zwischen

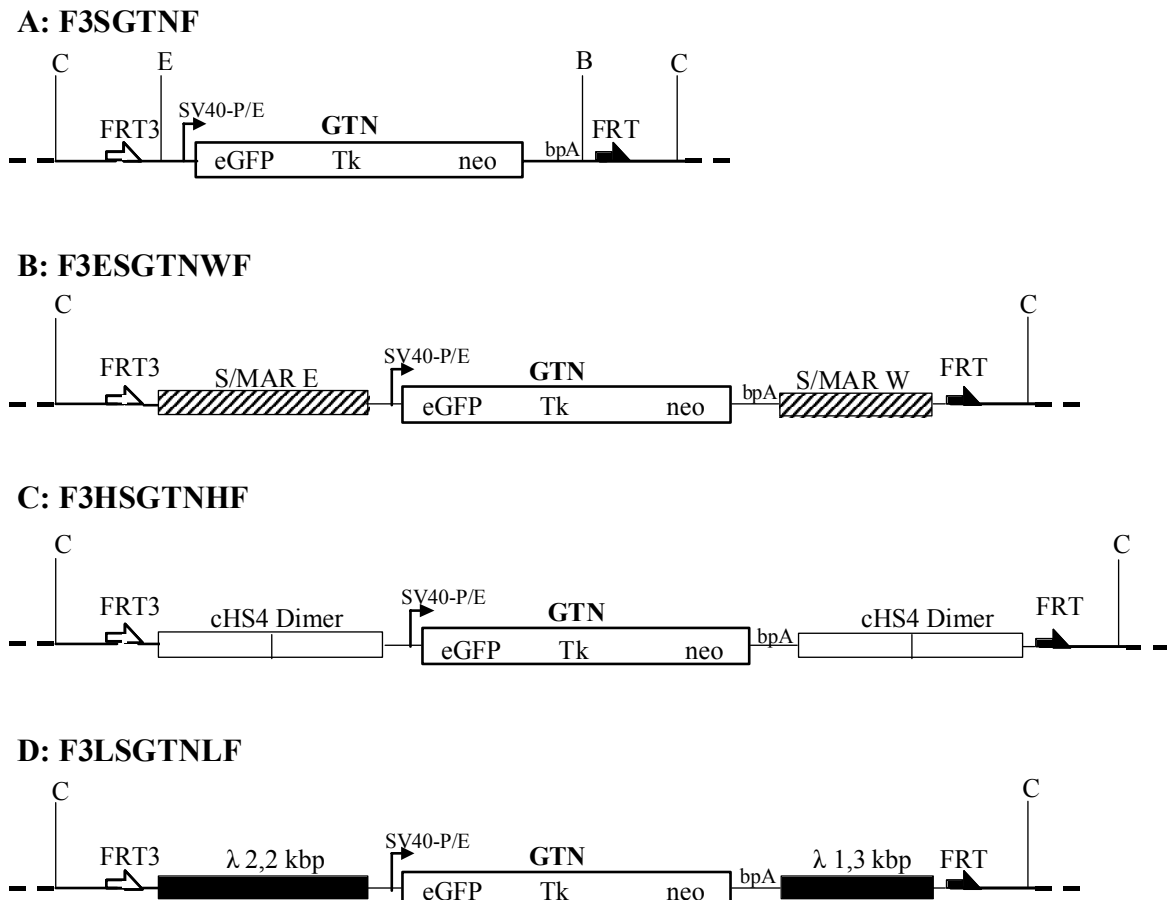


Abb. 2.14: Parentalkonstrukte für die Untersuchung der cis-agierenden Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren mittels RMCE.

Alle Konstrukte exprimieren das Fusionsgen GTN, welches sich aus den Genen für eGFP, Thymidinkinase und Neomycinphosphotransferase zusammensetzt, unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers. Die Termination des Transkripts findet an der Polyadenylierungsstelle des bovinen Wachstumshormogens statt (bpA). Der weiße Halbpfel symbolisiert die Mutante 3 der FRT-Site, der schwarze die Wildtyp-FRT-Site, zwischen denen ein Kassettenaustausch stattfinden kann. Die ClaI-Schnittstellen (C) dienen der Linearisierung vor der Elektroporation. Die genomische DNA ist als gestrichelte Linie dargestellt. **A:** Das Grundkonstrukt F3SGTNF ohne flankierende Elemente. **B:** Das mit den S/MAR-Elementen E und W (gestreifte Boxen) flankierte Konstrukt F3ESGTNWF. **C:** Das mit den cHS4-Insulator-Dimeren (weiße Boxen) flankierte Konstrukt F3HSGTNHF. **D:** Das mit den Lambda-Kontrollsequenzen (schwarze Boxen) flankierte Konstrukt F3LSGTNLF.

den unterschiedlichen Sites keine Kreuzrekombination erfolgt (Schlake und Bode, 1994). Zwischen F3-Site und Promotor befindet sich eine singuläre EcoRI-Schnittstelle und zwischen Poly(A)-Signal und der Wildtyp-FRT-Site eine singuläre BamHI-Schnittstelle. In diese Sites können die zu untersuchenden cis-agierenden Sequenzen inseriert werden. Im

Abstand von 139 bp außerhalb der F3-Site und 129 bp außerhalb der F-Site sind zwei ClaI-Schnittstellen lokalisiert. Diese sollen im folgenden zur Linearisierung der Konstrukte vor Elektroporation dienen, um die Einbringung eines Integrats mit definierten Enden zu gewährleisten. Nahezu das gesamte prokaryontische Vektorrückgrat wird hierbei entfernt, da dieses die Einflüsse des umgebenden Chromatins auf die Expressionskassette abschirmen könnte.

Es wurden zwei verschiedene S/MAR-Elemente, deren Wirkung auf die Expression des Reportergens eGFP analysiert werden sollte, in die dafür vorgesehenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI inseriert (Abb. 2.14B). In die EcoRI-Site wurde das 2,2 kbp große S/MAR-Element E aus dem 5' Bereich des humanen β -Interferongens (Bode und Maaß, 1988) eingefügt und in die BamHI-Site das 1,3 kbp große Pflanzen-S/MAR-Element W. Beide S/MAR-Elemente wurden bereits in Kap. 2.1 genauer beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass diese Kombination von S/MAR-Elementen bei Flankierung eines Luziferase-Reportergens einen deutlich transkriptionssteigernden Effekt in Klongemischen der Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 ausübt. Diese Beobachtung konnte ebenfalls in CHO-K1-Einzelklonen gemacht werden (Bode et al., 1998).

Zudem sollte untersucht werden, ob die S/MAR-Elemente E und W Insulator-Charakter besitzen und die Reporter-kassette von den Einflüssen des Integrationsorts abschirmen. Zu diesem Zweck wurde zum Vergleich die Reporter-Fusionskassette ebenfalls mit einer gut charakterisierten eukaryontischen Insulator-Sequenz flankiert (Abb. 2.14C). Hierbei handelt es sich um ein 2,4 kbp großes Dimer des cHS4-Insulators, eine DNase I hypersensitive Stelle aus dem β -Globin-Gencluster des Huhns (Chung et al., 1993). Diese verleiht positions-unabhängige Expression bei Flankierung des Transgens sowohl in Zelllinien (Pikaart et al., 1998) als auch in Drosophila (Chung et al., 1993) und transgenen Mäusen (Potts et al., 2000), und seine Eigenschaften sind detailliert beschrieben worden (Chung et al., 1997; Bell et al., 1999).

Der Insulator wurde in den Vektor F3SGTNF in der Orientierung eingebracht, welche in einer früheren Untersuchung (Emery et al., 2000) als effektiver für die Abschirmung von Positionseffekten identifiziert wurde. Die Fähigkeit der S/MAR-Elemente, positions-unabhängige Reportergenexpression zu gewährleisten, sollte nun mit der des cHS4-Insulators verglichen werden. Desgleichen sollte auch der Einfluss des Insulators auf Höhe und Stabilität der Expression im Vergleich zu den S/MAR-Sequenzen sowohl in zufälligen Loci

als auch im gleichen Integrationsort untersucht werden.

Für die Untersuchung der Einflüsse von cis-agierenden Elementen auf die Expression des Reportergens GTN ist es notwendig, als Vergleich die Expressionseigenschaften eines Kontrollkonstrukts ohne cis-agierende Sequenzen zu bestimmen. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung des Grundkonstrukts (Abb. 2.14A), welches nur die Expressionskassette flankiert von den FRT-Sites enthält. Allerdings befindet sich hier im integrierten Zustand das Reportergen näher zum umliegenden Chromatin als in den S/MAR- oder Insulator-haltigen Konstrukten. So könnte ein möglicher Einfluss dieser Sequenzen auf die Expression auf einen rein räumlichen Abstandseffekt zurückzuführen sein. Daher sollten möglichst neutral auf die Expression wirkende Sequenzen gleicher Länge wie die S/MAR-Elemente in die singulären Schnittstellen 5' und 3' der Expressionskassette eingesetzt werden. Hierfür wurden den S/MAR-Elementen in der Länge entsprechende DNA-Sequenzen aus dem Genom des Bakteriophagen Lambda verwendet. In einer früheren Untersuchung zur Wirkungsweise cis-agierender Elemente wurden ebenfalls Lambda-Genomabschnitte als Kontrollsequenzen verwendet (Walters et al., 1999). Als adäquate Kontrolle für die S/MAR-Wirkung sollten die Kontrollsequenzen keinerlei S/MAR-Aktivität aufweisen. Es gibt nur einen kleinen Bereich im Lambda-Genom zwischen 28,7 und 31,1 kbp, welcher 'Scaffold'-Aktivität aufweist (Mielke et al., 1990). Weiterhin treten in zwei Regionen zwischen 0 und 2 und zwischen 20 und 22 kbp 'Bending'-Maxima auf (Anderson, 1986), welche häufig in S/MARs vorkommen. Daher wurden als Kontrolle Sequenzen aus anderen Bereichen verwendet. In die EcoRI-Schnittstelle von F3SGTNF wurde ein 2,2 kbp großes Tsp509I-Fragment aus dem Lambda-Genom zwischen 10 und 12,2 kbp eingesetzt, in die BamHI-Schnittstelle ein 1,3 kbp großes Sau3AI-Fragment aus dem Bereich zwischen 13,8 und 15,1 kbp (Abb. 2.14D). Um sicherzugehen, dass die verwendeten Kontrollsequenzen keinerlei S/MAR-Aktivität besitzen, wurde ihr Matrixbindungspotenzial mithilfe eines S/MAR-Vorhersageprogrammes berechnet. S/MAR-Elemente zeichnen sich durch ihre Neigung zur DNA-Strangtrennung aus. Diese Doppelhelix-Destabilisierung korreliert mit der Stärke der Bindung an die Kernmatrix und somit mit der Fähigkeit zur Transkriptionserhöhung benachbarter Gene (Bode et al., 1998). Mittels eines SIDD-Profiles ('*stress-induced duplex-destabilization*') wird die Strangtrennung bei standardisierter superhelikaler Spannung berechnet (Benham et al., 1997). Abb. 2.15 zeigt die für die Vektoren F3ESGTNWF und F3LSGTNLF von Craig Benham (New York) berechneten SIDD-Profile. Hierbei wird die freie Enthalpie der Basenpaarbindung über der

Sequenz dargestellt. In Abb. 2.15A zeigen die beiden S/MAR-Elemente E und W eine Vielzahl deutlicher Peaks, welche auf eine erhöhte Neigung dieser Elemente zur Strangtrennung und damit auf eine hohe Wahrscheinlichkeit für Matrix-Bindung hindeuten. Im Gegensatz dazu haben die als Kontrolle verwendeten Lambda-Sequenzen keine Tendenz zur Strangtrennung (Abb. 2.15B), was dafür spricht, dass sie keine Matrix-bindenden Eigenschaften besitzen. In dem Konstrukt F3LSGTNLF treten nur die lokal begrenzten prägnanten Peaks am Promotor und Terminator des Ampicillin-Gens sowie am SV40-

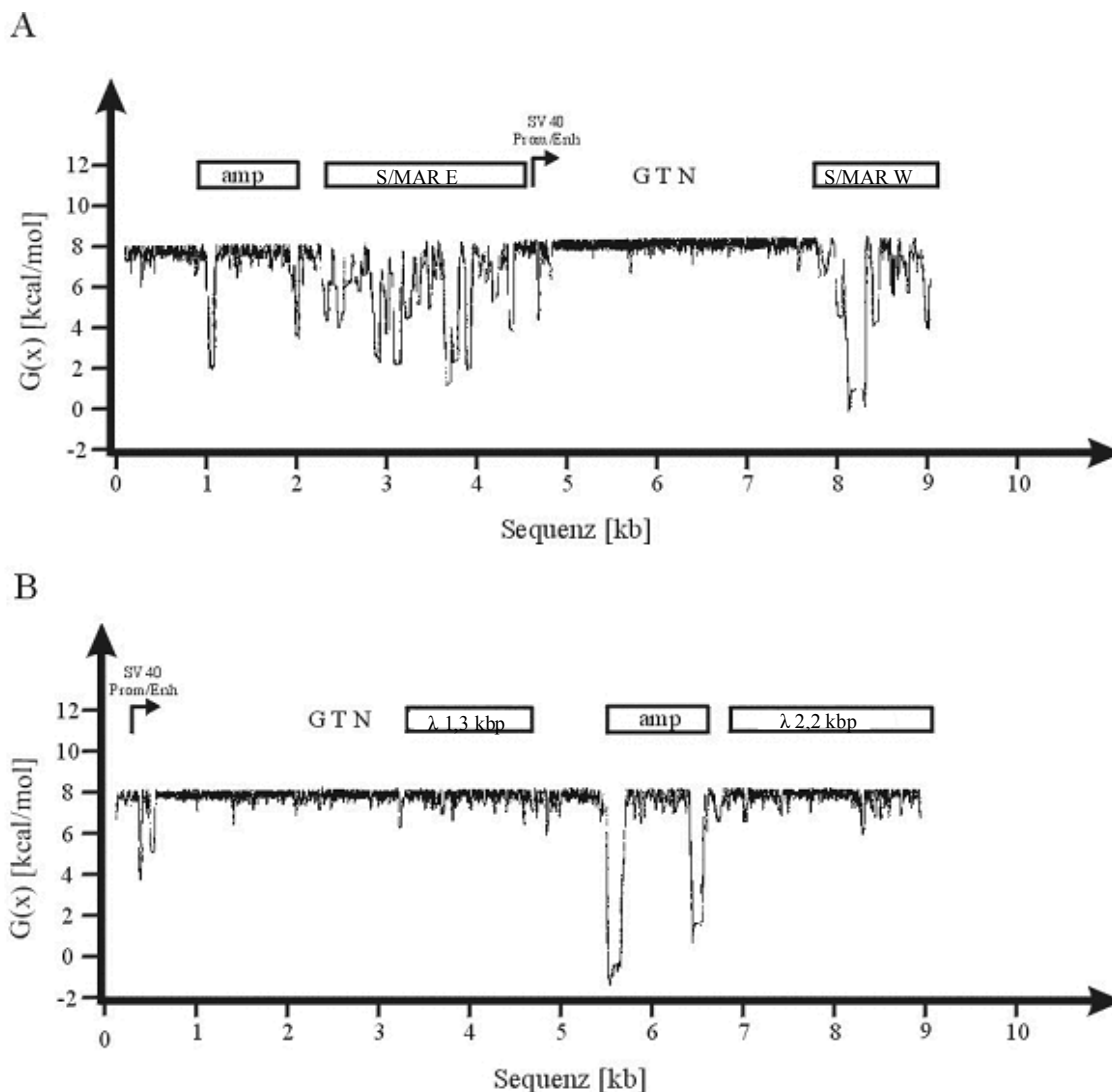


Abb. 2.15: 'Stress-induced duplex-destabilization'-Profil (SIDD) der Vektoren F3ESGTNWF (A) und F3LSGTNLF (B) (Craig Benham, New York).

Die freie Enthalpie der Basenpaarbindung ist über der Sequenz dargestellt. An den zur Strangtrennung neigenden Sequenzen der Vektoren treten charakteristische Peaks auf. Das Profil wurde von Craig Benham (New York) berechnet.

Promotor/Enhancer auf. Diese Peaks sind im Konstrukt F3ESGTNWF etwas kleiner, da sie von den starken Peaks der S/MAR-Elemente überlagert werden. Das SIDD-Profil zeigt also, dass die Lambda-Sequenzen keinerlei S/MAR-Aktivität besitzen und somit als Kontrolle für die Untersuchung cis-agierender Elemente auf die Genexpression im beschriebenen System verwendet werden können.

Zunächst sollte eine statistisch signifikante Anzahl von Einzelklonen mit singulärer Kopie der drei die verschiedenen flankierenden Sequenzen enthaltenden Konstrukte angelegt werden. Falls sich Unterschiede in den Expressionseigenschaften der Einzelklone ergeben, sollte die Wirkung dieser Elemente auf die Transgenexpression im gleichen Integrationsort genauer analysiert werden. Das Prinzip des hierfür notwendigen Austausches der Genkassetten ist in Abb. 2.16 beispielhaft dargestellt. Hier wird im gleichen Integrationsort durch Expression der Flp-Rekombinase eine mit Kontrollsequenzen flankierte Kasette gegen eine mit den S/MAR-Elementen flankierte Kasette ausgetauscht. Das Austauschereignis wird auf den Verlust des im Parentalkonstrukt enthaltenen Negativselektionsmarkers Thymidinkinase angereichert. Im Austauschplasmid enthält die von den zu untersuchenden Sequenzen flankierte Expressionskasette eine Fusion aus zwei Reportergenen, dem Luziferase-Gen, welches eine sensitive Quantifizierung der Expressionshöhe eines Zelllysats ermöglicht, und dem eGFP-Gen, dessen Genprodukt in einzelnen Zellen nachgewiesen werden kann. Promotor und Polyadenylierungsstelle sind in Parental- und Austauschkonstrukten jeweils identisch. Da die Expression des Fusionsgens GTN nicht direkt mit der des Fusionsgens Luzi-eGFP verglichen werden kann, muss ein Kontrollaustausch mit einem Austauschkonstrukt erfolgen, in dem das Reporter-Fusionsgen von den gleichen Elementen wie das genomisch integrierte Parentalkonstrukt flankiert ist (Abb. 2.16 unten). Durch Vergleich der Expression der nach Austausch erhaltenen Klone kann direkt auf die Wirkungsweise der zu untersuchenden Elemente geschlossen werden, da das umliegende Chromatin identisch ist. Neben einem Cis-Effekt wird als Mechanismus der S/MAR-Wirkung ein 'Targeting'-Effekt diskutiert, welcher bewirkt, dass S/MAR-haltige Konstrukte aufgrund ihrer Affinität zur Kernmatrix preferentiell in aktives Chromatin integrieren (Bode et al., 1998). Mithilfe des vorgestellten Systems könnte erstmalig zwischen den beiden Mechanismen unterschieden werden. Kommt es beispielsweise nach dem in Abb. 2.16 dargestellten Austausch von S/MAR- gegen integrierte Kontroll-Sequenzen zu einer Erhöhung der Expression, spricht dies für einen aktivierenden Effekt der S/MAR-Elemente auf die Transkriptionsinitiation. Ein reziproker Austausch von

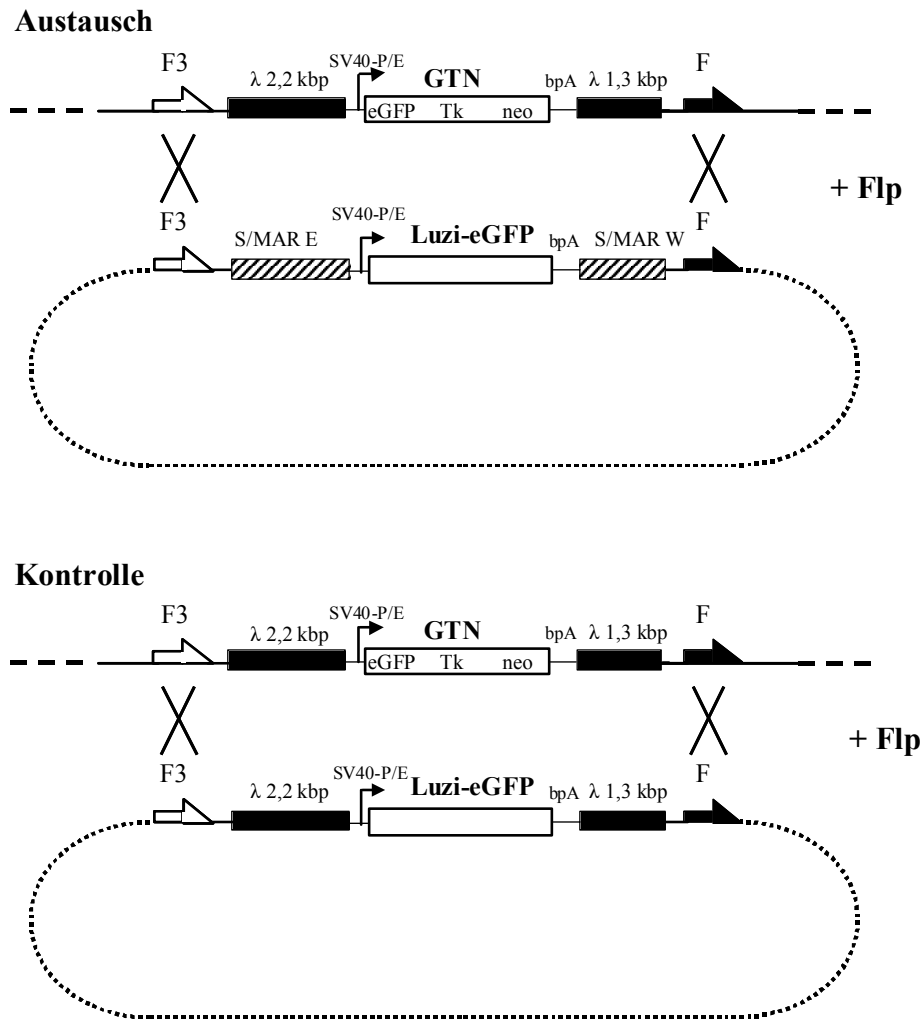


Abb. 2.16: Schematische Darstellung des Kassettenaustausches zur Untersuchung der Wirkung cis-agierender Elemente.

Im oberen Bild ist der Austausch der mit Lambda-Kontrollen flankierten GTN-Expressionskassette gegen eine mit den S/MAR-Elementen E und W flankierte Luzi-eGFP-Expressionskassette dargestellt. Die Reaktion wird durch die Flp-Rekombinase katalysiert. Zur Kontrolle muss ein Austausch gegen die Luzi-eGFP-Kassette flankiert mit den Lambda-Sequenzen erfolgen (unteres Bild). Die Anreicherung des Austauschereignisses erfolgt über Negativselektion auf den Verlust der Thymidinkinase hin.

Lambda- gegen integrierte S/MAR-Sequenzen müsste in diesem Fall einen reprimierenden Einfluss auf die Expression haben. Falls die beschriebenen Austauschreaktionen keinen deutlichen Effekt haben, deutet dies auf einen ‘Targeting’-Effekt der S/MAR-Elemente hin. Falls dieser Mechanismus zutrifft, würden die S/MAR-Elemente die Integration der Expressionskassette in transkriptionell aktives Chromatin fördern und ihr Austausch hätte keine weiteren Folgen mehr. Um die Wirkungsweise von S/MAR-Elementen genauer zu

analysieren, soll auch der Austausch von S/MAR- gegen Insulator-Elemente und umgekehrt vorgenommen werden und die Auswirkung auf die Reporterexpression untersucht werden. Das vorgestellte Konzept ermöglicht also nicht nur die vergleichende Analyse cis-agierender Sequenzen in unabhängig generierten Klonen und im gleichen Integrationsort, sondern lässt auch Rückschlüsse auf die Ursachen der gemessenen Effekte zu.

Vor den Expressionsanalysen der verschiedenen Konstrukte im stabil ins Genom integrierten Zustand sollte zunächst die transiente Expression der Konstrukte überprüft werden. Die S/MAR-Elemente sollten die transiente Expression nicht beeinflussen, da sie ihre Wirkung erst nach Integration ins Genom ausüben (Klehr et al., 1991). Die Konstruktion der in Abb. 2.14 dargestellten Vektoren, die Analysen der transienten Expression und die Anlage eines Teils der in Kap. 2.3.3.1 beschriebenen Einzelkopieklone fanden in Zusammenarbeit mit Kristina Nehlsen (GBF Braunschweig) im Rahmen ihrer Diplomarbeit statt (Nehlsen, 2000).

2.3.2 Wirkung der cis-agierenden Elemente auf die transiente Expression

Um die Wirkung der verwendeten S/MAR-Elemente und Insulatoren sowie der Lambda-Kontrollsequenzen auf die Expression des Reporters GTN im transienten Status zu überprüfen, wurden die verschiedenen Konstrukte F3ESGTNWF, F3HSGTNHF, F3LSGTNLF und das Basiskonstrukt F3SGTNF in je 1×10^5 CHO-K1-Zellen nach dem ‘Gene Porter’-Transfektionsprotokoll transfiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Konstrukte wurden äquimolare Mengen eines jeden Konstrukts verwendet, damit in jedem Transfektionsansatz die zu untersuchende DNA in der gleichen Kopienzahl vorliegt. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde eine Cotransfektion mit einem Luziferase-exprimierenden Plasmid durchgeführt. Da in jedem Transfektionsansatz die gleiche Gesamtmenge an DNA vorliegen sollte, wurde nach Bedarf mit nicht exprimierender DNA aufgefüllt. Zwei Tage nach Transfektion wurde die eGFP-Expression im FACS und die Luziferase-Expression im Luminometer ermittelt (Daten nicht gezeigt). In Abb. 2.17 ist die relative transiente eGFP-Expression der verschiedenen Parentalkonstrukte nach Abgleich über die Transfektionseffizienz dargestellt. Alle Konstrukte sind funktionell, d.h. sie exprimieren das Fusionsgen GTN. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expressionshöhe zwischen den einzelnen Konstrukten erkennbar. Dies entspricht früheren Beobachtungen,

dass S/MAR-Elemente die transiente Expression nicht bzw. negativ beeinflussen (Klehr et al., 1991). Daher sollte nachfolgend die cis-agierende Wirkung der zu untersuchenden Elemente nach stabiler Integration ins Genom analysiert werden.

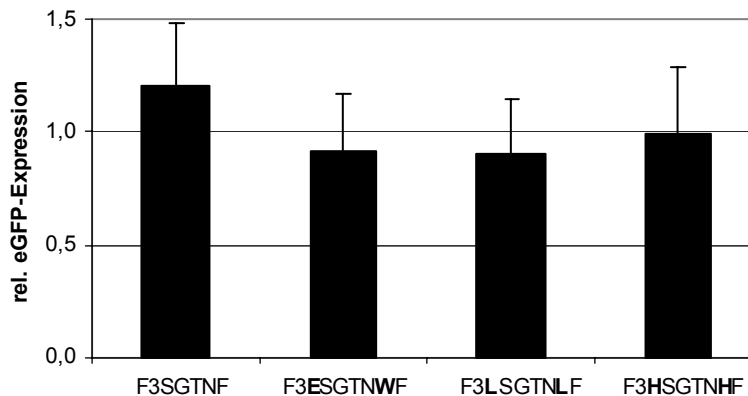


Abb. 2.17: Transiente eGFP-Expression der Parentalkonstrukte mit unterschiedlichen flankierenden Elementen.

Die relative eGFP-Expression ist als Mittelwert aus fünf unabhängigen Messungen nach Abgleich über die Transfektionseffizienz und den Mittelwert der verschiedenen Messungen dargestellt. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt.

2.3.3 Wirkung der cis-agierenden Elemente auf die stabile Expression in Einzelkopieklonen

Cis-agierende Elemente wie S/MARs und Insulatoren können im genomisch integrierten Zustand einen Einfluss auf Höhe und Stabilität der Expression ausüben (Kap. 2.2.2.4 und 2.2.3.4; Pikaart et al., 1998). Daher sollten diese Parameter untersucht werden. Da die Expressionseigenschaften eines Transgens entscheidend vom Integrationsort beeinflusst werden, war es notwendig, diese Untersuchungen in einer statistisch signifikanten Anzahl von Einzelkopieklonen durchzuführen (siehe Kap. 2.2).

2.3.3.1 Generierung von Einzelklonen mit singulärer Kopie

Um Einzelklone mit einem singulären und definierten Integrat der Vektoren F3ESGTNWF, F3HSGTNHF und F3LSGTNLF zu generieren, wurden die Konstrukte nach Linearisierung

an den dafür vorgesehenen ClaI-Restriktionsschnittstellen (siehe Kap. 2.3.1) in je 1×10^6 CHO-K1-Zellen per Elektroporation eingebracht. Nach achttägiger Selektion mit G418 wurden von allen Ansätzen Klone isoliert.

Die Sicherstellung der Einzelkopieintegration wurde über einen Randfragmentnachweis im Southern Blot durchgeführt. Da sich die flankierenden Sequenzen in den drei Konstrukten unterscheiden, mussten in den entstandenen Klonserien verschiedene Restriktionsschnitte durchgeführt werden.

Für die Identifizierung der Kopienzahl in den Klonen mit den S/MAR- und Insulator-haltigen Konstrukten wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym BglI verdaut. BglI schneidet dreimal in F3ESGTNWF und F3HSGTNHF (Abb. 2.18A und B). Durch Hybridisierung mit einer Sonde, welche außerhalb der Schnittstellen liegt, werden Randfragmente nachgewiesen, deren Größe vom Abstand der nächstgelegenen BglI-Schnittstelle in der genomischen Umgebung abhängig ist. Somit ist für jeden Integrationsort ein Randfragment typischer Größe zu erwarten. Abb. 2.18 D und E zeigen exemplarisch Southern Blot Analysen einiger S/MAR- und Insulator-haltiger Einzelklone nach Hybridisierung mit einer Sonde gegen das *neo^r*-Gen. Die mit Zahlen markierten Klone enthalten eine singuläre Kopie der Vektoren. Dies konnte für einige dieser Klone durch Rehybridisierung mit einer Sonde gegen den SV40-Promotor/Enhancer bestätigt werden, welche das 5'-Randfragment nachweist (Daten nicht gezeigt).

Die genomische DNA der Kontrollklone mit Integration des Vektors F3LSGTNLF wurde mit dem Restriktionsenzym KpnI verdaut, welches zweimal im Konstrukt schneidet (Abb. 2.18C). Abb. 2.18F stellt eine exemplarische Southern Blot Analyse einiger dieser Klone dar. Auch hier wurden die singulären Integrationen durch eine Rehybridisierung mit einer zweiten Sonde aus der 5'-Lambda-Sequenz bestätigt (Daten nicht gezeigt.)

Es konnten 49 Klone mit singulärer Integration des S/MAR-Vektors, 39 Klone mit singulärer Integration des cHS4-Vektors und 59 Klone mit singulärer Kopie des Kontrollvektors F3LSGTNLF generiert werden (Tab. 2.7). Der Einzelkopieanteil in der Gesamtklonpopulation lag zwischen 29% und 46%. Da die Einzelkopieklone nach Feststellung ihrer Expressionseigenschaften für den Austausch gegen Kassetten mit anderen flankierenden Sequenzen durch RMCE genutzt werden sollten, war es notwendig, die Intaktheit der integrierten Konstrukte nachzuweisen.

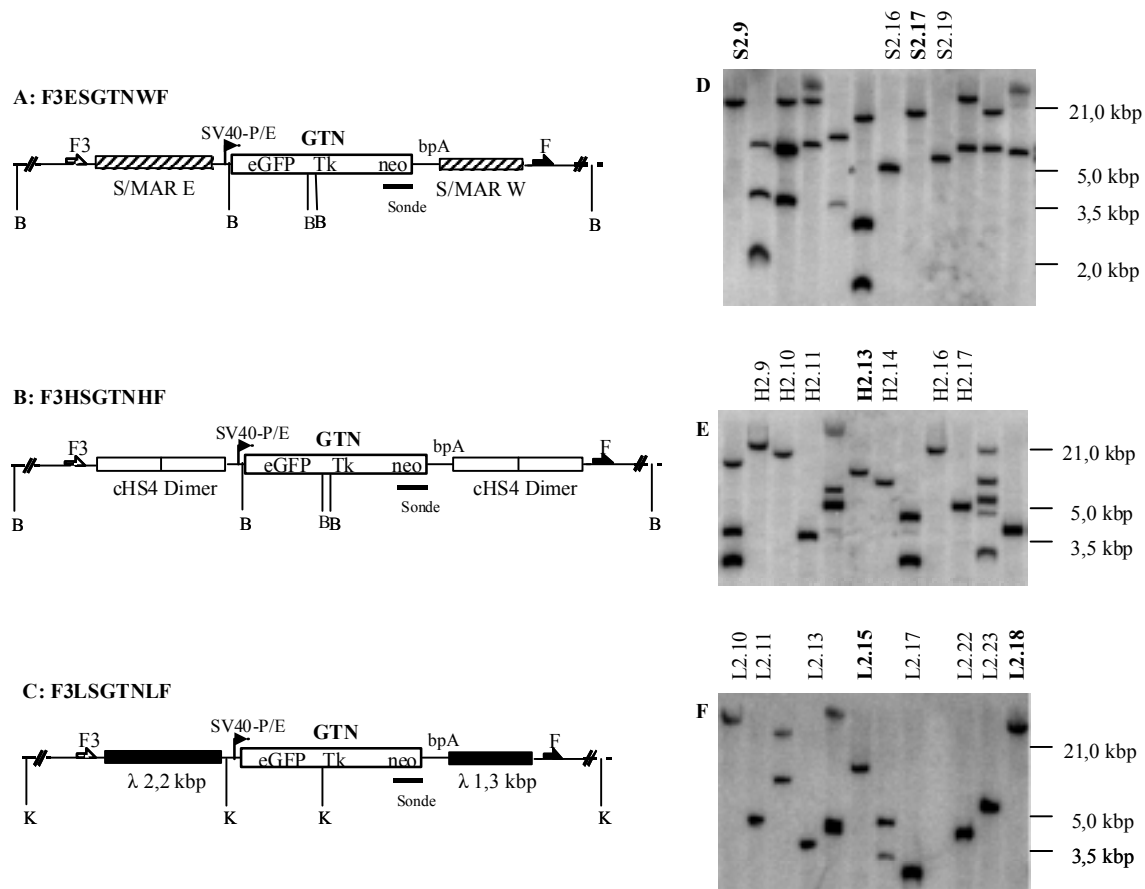


Abb. 2.18: Nachweis der Kopienzahl der Parentalkonstrukte mit unterschiedlichen flankierenden Elementen.

A-C: Schema der Vektoren nach Integration. **B:** Restriktionsschnittstelle für BglI. **K:** Restriktionsschnittstelle für KpnI. Die zur Hybridisierung verwendete neo-Sonde ist als schwarzer Balken dargestellt.

D-F: Southern Blots einiger Klone nach Hybridisierung mit der neo-Sonde. Spuren mit nur einer Bande enthalten genomische DNA von Klonen mit singulärer Kopie des Vektors und sind mit den Klonnamen gekennzeichnet. Die Namen der Klone, welche im folgenden für die Expressionsstudien verwendet wurden, sind dick gedruckt. **D:** Southern Blot von Klonen mit dem Vektor F3ESGTNWF, **E:** Southern Blot von Klonen mit dem Vektor F3HSGTNHF, **F:** Southern Blot von Klonen mit dem Vektor F3LSGTNLF.

2.3.3.2 Überprüfung der Intaktheit der integrierten Einzelkopiekonstrukte mittels PCR

Um einen Kassettenaustausch in den Klonen mit singulärer Kopie durchführen zu können, mussten die Konstrukte vollständig integriert sein. Da die Konstrukte vor der Elektroporation im Abstand von nur 139 bzw. 129 bp zu den FRT-Sites linearisiert wurden, sollte die

Vollständigkeit der 5'- und 3'-Bereiche der Konstrukte festgestellt werden. Hierzu wurden PCR-Analysen der genomischen DNA durchgeführt, welche in Abb. 2.19A und C schematisch dargestellt sind. Eine PCR mit den Primern BB4, welcher direkt vor der F3-Site bindet, und GFP6, dessen Bindungsstelle sich in der eGFP-Sequenz befindet, amplifiziert bei Intaktheit des 5'-Bereichs ein 2,8 kbp großes Fragment für die Konstrukte F3ESGTNWF und F3LSGTNLF. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des 3'-Bereichs der integrierten Konstrukte wurde eine PCR mit den Primern NEO5, dessen Bindungsstelle sich in der *neo'*-Sequenz befindet und BB3, welcher direkt hinter der F-Site bindet, durchgeführt. Für die Konstrukte F3ESGTNWF und F3LSGTNLF wird ein Fragment einer Größe von 1,8 kbp amplifiziert. In Abb. 2.19B sind die beschriebenen PCR-Nachweise exemplarisch am Beispiel der Kontrollklone L10 und L24 dargestellt. Die 5'- und 3'-Bereiche des integrierten Konstrukts F3HSGTNHF konnten mit den beschriebenen PCR-Ansätzen nicht amplifiziert werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist das Vorhandensein von Sekundärstrukturen in der cHS4-Insulator-Sequenz. Daher wurden für die Überprüfung der Intaktheit dieses Konstrukts mit Primern, welche an die Insulator-Sequenz binden, kürzere Bereiche amplifiziert. Eine PCR mit den Primern BB4 und HS10 amplifiziert bei intaktem 5'-Bereich ein 490 bp großes Fragment, bei intaktem 3'-Bereich ergibt sich mit den Primern HS9 und BB3 ein 653 bp großes Fragment. (Abb. 2.19C). Abb. 2.19D zeigt diese PCR-Nachweise am Beispiel der Klone H36, H38 und H52. Zur Kontrolle der Qualität der genomischen DNA wurde eine PCR mit den Primern GFP7 und NEO8 durchgeführt, wobei ein internes 2,5 kbp großes Fragment bei allen Konstrukten nachgewiesen wird (Abb. 2.19A,B und C).

21 bis 29% aller untersuchten Einzelkopieklone tragen ein 5' und 3' vollständiges Integrat (Tab. 2.7) und können somit für RMCE verwendet werden. Zunächst sollten jedoch ihre Expressionseigenschaften in Abhängigkeit vom integrierten Konstrukt charakterisiert werden. Hierfür standen 19 Klone mit flankierenden S/MAR-Sequenzen, acht mit flankierenden Insulator-Sequenzen und 14 Kontrollklone zur Verfügung.

Konstrukt	untersuchte Klone gesamt	Anzahl Einzelkopie	Anteil Einzelkopie [%]	Anzahl intakter Klone	Anteil intakter Klone [%]
F3ESGTNWF	162	49	31	14	29
F3HSGTNHF	138	39	29	8	21
F3LSGTNLF	128	59	46	15	25

Tab. 2.7: Effizienz von Einzelkopieintegration und Vollständigkeit der verschiedenen Konstrukte.

Der prozentuale Anteil intakter Klone bezieht sich auf die Anzahl der Einzelkopieklone.

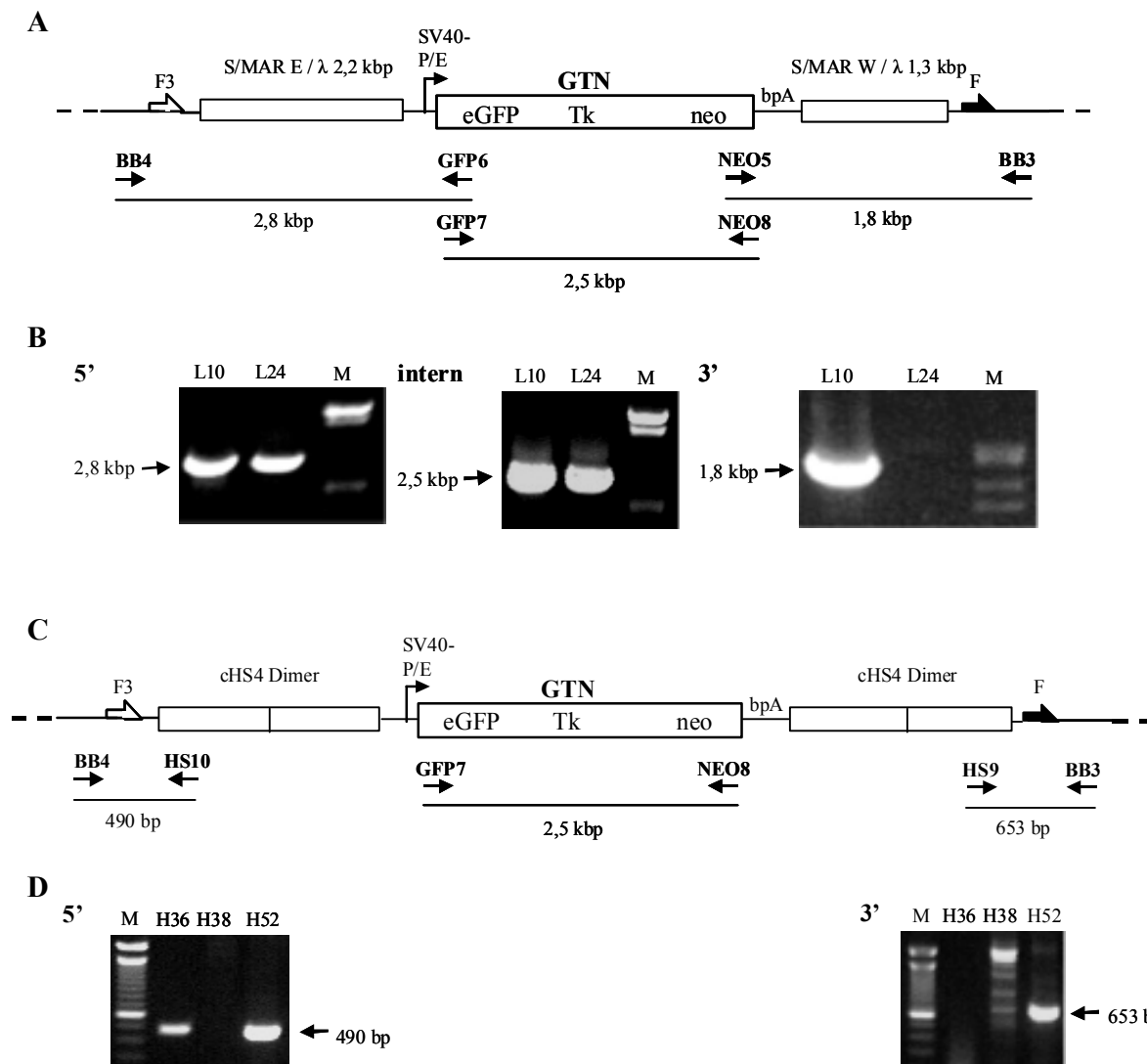


Abb. 2.19: PCR-Analysen zur Überprüfung der Vollständigkeit der integrierten Einzelkopien.

A: Schematische Darstellung der PCR zur Überprüfung der Vollständigkeit der integrierten Vektoren F3ESGTNWF und F3LSGTNLF. Eine PCR mit den Primern BB4 und GFP6 amplifiziert bei Intaktheit des 5'-Bereichs ein 2,8 kbp großes Fragment, eine PCR mit den Primern NEO5 und BB3 amplifiziert bei Intaktheit des 3'-Bereichs ein 1,8 kbp großes Fragment. Eine Kontroll-PCR mit den Primern GFP7 und NEO8 weist ein internes 2,5 kbp großes Fragment nach.

B: Amplifizierung des 5', des internen und des 3'-Bereichs am Beispiel der Klone L10 und L24. Marker: λ HindIII/EcoRI.

C: Schematische Darstellung der PCR zur Überprüfung der Vollständigkeit des integrierten Vektors F3HSGTNHF. Eine PCR mit den Primern BB4 und HS10 amplifiziert bei Intaktheit des 5'-Bereichs ein 490 bp großes Fragment, eine PCR mit den Primern HS9 und BB3 amplifiziert bei Intaktheit des 3'-Bereichs ein 653 bp großes Fragment. Eine Kontroll-PCR mit den Primern GFP7 und NEO8 weist ein internes 2,5 kbp großes Fragment nach.

D: Amplifizierung des 5'-und des 3'-Bereichs am Beispiel der Klone H36, H38 und H52. Marker: 100 bp-Leiter (BRL).

2.3.3.3 Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren auf die Expressionshöhe in Einzelkopieklonen

Zunächst sollte der Einfluss der flankierenden cis-agierenden Elemente auf die Expressionshöhe in einer statistisch signifikanten Anzahl von Einzelklonen bestimmt werden. Hierzu wurde die eGFP-Expression der Klone mit vollständiger Einzelkopie des S/MAR- und Insulator-Konstrukts sowie des Lambda-Kontrollkonstrukts im FACS gemessen. Abb. 2.20 zeigt die Expressionshöhen der Klone als Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Die durchschnittliche Expression der Einzelklone ist Tab. 2.8 zu entnehmen. Die Klone, welche das Insulator-Dimer cHS4 enthalten, haben mit 123,9 durchschnittlichen

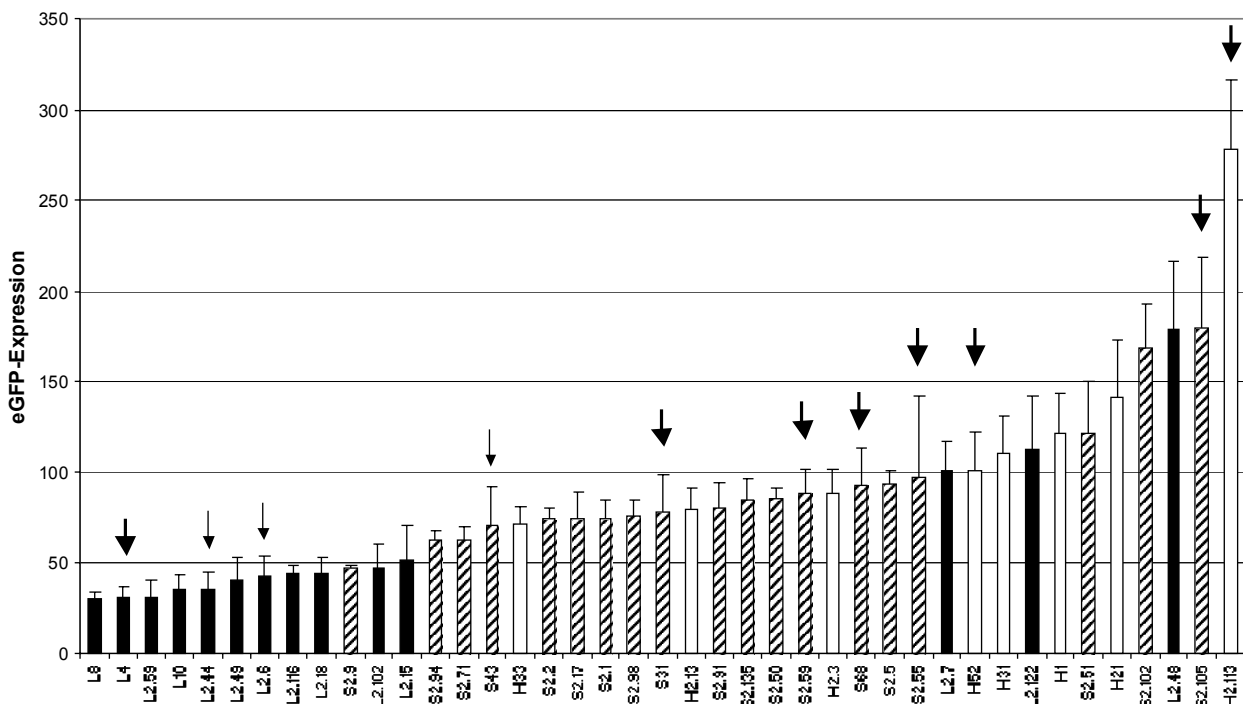


Abb. 2.20: Expressionshöhe der intakten Einzelkopieklone mit verschiedenen das Transgen flankierenden Elementen.

Gezeigt ist die eGFP-Expressionshöhe als Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Messungen. Die Expressionshöhen der S/MAR-flankierten Klone sind als gestreifte Balken, die der Insulator-flankierten als weiße Balken und die der Lambda-flankierten Kontrollklone als schwarze Balken dargestellt. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt. Die Klone, welche während der Langzeitkultivierung Expressionsinaktivierung eines Teils der Zellen zeigen, sind mit einem dicken Pfeil markiert. Die Klone, bei denen während der Langzeitkultivierung eine Absenkung der Expressionshöhe zu beobachten ist, sind mit einem dünnen Pfeil markiert.

Fluoreszenzeinheiten die höchste Expression. Diese ist 2,1 mal höher als die durchschnittliche Expression der Klone mit den Lambda-Kontrollsequenzen, welche 58,7 Fluoreszenzeinheiten beträgt. Die Klone mit den S/MAR-Elementen E und W haben eine 1,5 mal höhere Durchschnittsexpression als die Kontrollklone. Sie beträgt 90 Fluoreszenzeinheiten.

Da Insulatoren die Expression von Einflüssen der chromosomalen Umgebung abschirmen (Pikaart et al., 1998), wurde die Schwankungsbreite der Expression in den drei verschiedenen Klonserien bestimmt. Die Expression der Klone mit S/MARs und Insulatoren variiert um den Faktor 3,9 und ist somit homogener als die Expression der Kontrollklone (Tab. 2.8).

Konstrukt	durchschnittliche Expressionshöhe [Fluoreszenzeinheiten]	Schwankungsbreite
F3LSGTNLF	58,7	5,9
F3ESGTNWF	90,0	3,9
F3HSGTNHF	123,9	3,9

Tab. 2.8: Durchschnittliche Höhe und Schwankungsbreite der eGFP-Expression der Einzelklone mit unterschiedlichen flankierenden Elementen.

Die Flankierung der Expressionskassette mit den S/MAR-Elementen E und W oder mit dem cHS4-Dimer aktiviert die Transkription des eGFP-Reporters und schirmt von Positionseffekten ab. Im folgenden sollte untersucht werden, ob diese Elemente ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Expression haben.

2.3.3.4 Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren auf die Stabilität der Expression in Einzelkopieklonen

Um den Einfluss der flankierenden Sequenzen auf die Langzeitstabilität der eGFP-Expression zu bestimmen, wurden die in Kap. 2.2.3.3 bezüglich ihrer Expressionshöhe charakterisierten Klone über 31 Passagen in An- und Abwesenheit von G418 kultiviert. Da im Fusionsgen GTN Reporter- und Selektionsfunktion gleichermaßen exprimiert werden, kann ein Verlust der Expression nur bei Kultivierung ohne Selektionsdruck nachgewiesen werden. Die Expression der Einzelklone wurde während der Kultivierungsdauer in regelmäßigen Abständen durch FACS-Analyse bestimmt. Ein Verlust der Expression fand auf zweierlei Weise statt: Bei einigen Klonen verringerte sich der Anteil eGFP-exprimierender Zellen

(gekennzeichnet durch dicke Pfeile in Abb. 2.20), bei anderen erniedrigte sich die Expressionshöhe aller Zellen (gekennzeichnet durch dünne Pfeile in Abb. 2.20). Während sich bei 26,3% der S/MAR-Klone und 25% der Insulator-Klone der Anteil exprimierender Zellen verringerte, war dies nur in einem der Kontrollklone der Fall. Allerdings war in diesem Klon (L4) die Inaktivierungsrate am höchsten (Abb. 2.21). Die Klone, in denen das Transgen mit dem Insulator-Dimer flankiert ist, zeigen die niedrigste Inaktivierungsrate, die S/MAR-Klone haben niedrige bis mittlere Inaktivierungsraten (Abb. 2.21). In Abb. 2.22A ist exemplarisch für je einen Vertreter der drei Klonserien die Reduktion des Anteils exprimierender Zellen als FACS-Analyse dargestellt.

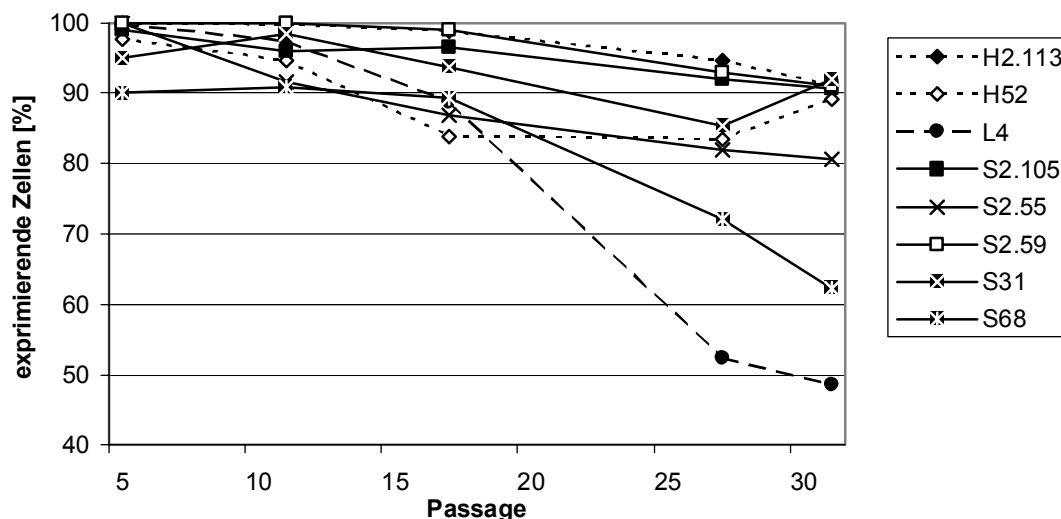


Abb. 2.21: Verlauf der Expressionsinaktivierung bei Einzelklonen, welche die Expression eines Teils der Zellen verlieren.

Dargestellt ist der Anteil eGFP-exprimierender Zellen bei Kultivierung in Abwesenheit von G418 über 31 Passagen. H: cHS4-Klone, S: S/MAR-Klone, L: Lambda-Klone.

Die Expressionshöhe aller Zellen wurde in einem S/MAR- und zwei Kontrollklonen signifikant um mehr als 30% erniedrigt (Abb. 2.22B). Der Klon S43 zeigt bei Passage 31 eine Erniedrigung der Expression um 54,4%, die Kontrollklone L2.6 und L2.44 um 48,1% bzw. 38,2%. Aus Abb. 2.20 wird deutlich, dass die Erniedrigung der Expressionshöhe nur bei Klonen mit ohnehin niedrigem Expressionsniveau auftritt, während der Verlust der Expression einzelner Zellen in Klonen aller Expressionshöhen zu finden ist. Tab. 2.9 fasst die Expressionsstabilität der Klonserien mit den unterschiedlichen flankierenden Elementen zusammen.

Konstrukt	Anteil der Klone mit Expressionsverlust einzelner Zellen [%]	durchschnittlicher Anteil nicht exprimierender Zellen [%]	Anteil der Klone mit Erniedrigung der Expressionshöhe [%]	durchschnittliche Erniedrigung der Expressionshöhe [%]
F3LSGTNLF	7	51,4	14,3	37,2
F3ESGTNWF	26,3	16,7	5,3	41,8
F3HSGTNHF	25	9,9	0	-

Tab. 2.9: Expressionsstabilität der Klonserien in Abhängigkeit von den das Transgen flankierenden Elementen.

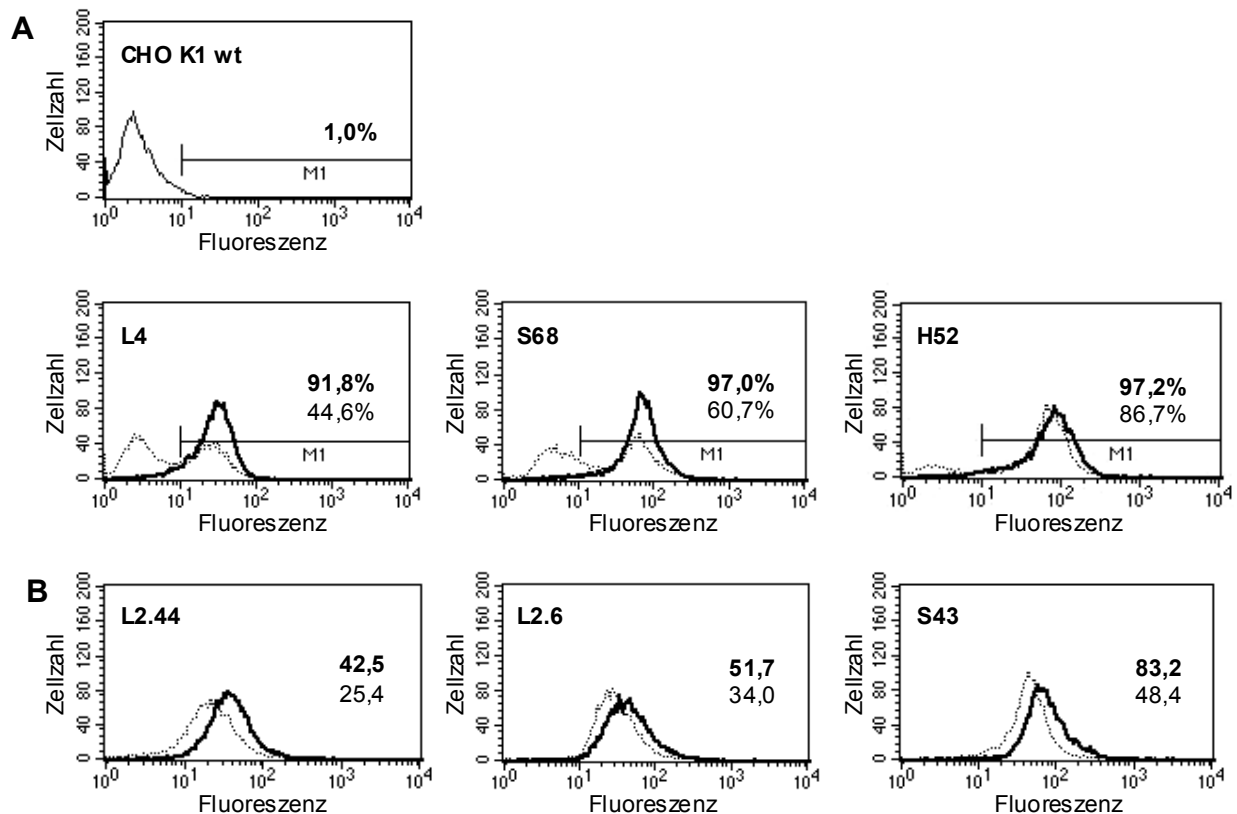


Abb. 2.22: Verlust der eGFP-Expression durch zwei unterschiedliche Mechanismen.

A: Histogramm-Plots von Klonen bei Passage 31, bei welchen eine Reduktion des Anteils exprimierender Zellen stattfindet. Die Zellzahl ist gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Das Expressionsprofil der Zellen, welche unter Selektionsdruck gehalten wurden, ist als dicke Linie dargestellt. Die dünne gestrichelte Linie symbolisiert das Expressionsprofil der in Abwesenheit von G418 kultivierten Zellen. Die Grenze M1 markiert den Bereich exprimierender Zellen. Sie wird festgelegt durch die Expressionshöhe, welche in der CHO-K1-Wildtyp-Kontrolle (obere Abb.) 1% der Zellen überschritten haben. Der Anteil der unter Selektionsdruck gehaltenen Zellen in M1 ist dick gedruckt, der Anteil der ohne Selektionsdruck gehaltenen Zellen in M1 ist dünn gedruckt.

B: Histogramm-Plots von Klonen bei Passage 31, bei welchen die Expressionshöhe aller Zellen sinkt. Das Expressionsprofil der Zellen, welche unter Selektionsdruck gehalten wurden, ist als dicke Linie dargestellt. Die Expressionshöhe dieser Zellen ist dick gedruckt. Die dünne gestrichelte Linie symbolisiert das Expressionsprofil der in Abwesenheit von G418 kultivierten Zellen. Die Expressionshöhe dieser Zellen ist dünn gedruckt.

Die Untersuchung der Expressionsstabilität zeigt, dass der Einfluss der das Transgen flankierenden S/MAR- und Insulator-Elemente differenziert betrachtet werden muss. Diese cis-agierenden Elemente erhöhen zwar im Vergleich zu den Lambda-Kontrollelementen den Anteil der Klone, in welchen einzelne Zellen komplett die Expression verlieren, jedoch war die Rate der Inaktivierung in den instabilen S/MAR- und cHS4-flankierten Klonen deutlich geringer als in dem instabilen Lambda-Kontrollklon. Hierbei ist anzumerken, dass bei dem am stärksten inaktivierten S/MAR-Klon S68 der Expressionsverlust auf eine Deletion des Konstrukts bei Kultivierung in Abwesenheit von Selektionsdruck zurückzuführen war. Der stark inaktivierte Klon L4 hingegen besaß das Transgen noch (Daten nicht gezeigt). Weiterhin verringern die S/MAR-Elemente die Wahrscheinlichkeit der Expressionserniedrigung aller Zellen eines Klons. Flankierung mit dem cHS4-Insulator verhindert die Reduktion der Expressionshöhe aller Zellen (Tab. 2.9).

Die Untersuchung der Expressionseigenschaften der Einzelkopieklone mit verschiedenen das Transgen flankierenden Elementen macht einen aktivierenden Einfluss der S/MAR-Elemente E und W sowie des cHS4-Insulator-Dimers auf die Höhe der Expression deutlich. Es konnte jedoch kein genereller Effekt dieser Elemente auf die Langzeitstabilität der Expression festgestellt werden. Auch in dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Expressionseigenschaften des Transgens stark vom Integrationsort abhängig sind. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zu untersuchenden cis-agierenden Sequenzen die Integration des Transgens in Chromatinbereiche mit bestimmten Einflüssen auf die Genexpression fördern. Daher war es notwendig, im folgenden die Wirkung der verschiedenen flankierenden Elemente vor dem gleichen genomischen Hintergrund zu untersuchen. Dazu sollte, wie in Kap. 2.3.1 näher beschrieben, in den bezüglich ihrer Expressionseigenschaften charakterisierten Klonen, die Expressionskassette gegen einen mit anderen Sequenzen flankierten Reporter mittels RMCE ausgetauscht werden.

2.3.4 Analyse der Wirkung der cis-agierenden Elemente im gleichen Integrationsort mittels RMCE

Ziel des zweiten Teils der vergleichenden Untersuchung von S/MAR-Elementen und Insulatoren war es, in einigen der im vorigen Kapitel charakterisierten Klone, die integrierte Parentalkassette durch Austauschkonstrukte mit verschiedenen den Reporter flankierenden Elementen zu ersetzen (siehe Abb. 2.16). Die derart generierten Austauschklone sollten hinsichtlich der Höhe und Stabilität der Expression des Reporters Luzi-eGFP charakterisiert werden. So kann nicht nur der Einfluss der zu untersuchenden Elemente auf die Genexpression analysiert werden, sondern es ist auch eine Abschätzung der Wirkungsweise möglich. Hierbei kann ein transaktivierender Einfluss der Elemente von einem Lokalisierungseffekt unterschieden werden (Kap. 2.3.1). Vor der Durchführung der Austauschreaktionen wurde zunächst die Funktionalität der Austauschkonstrukte überprüft.

2.3.4.1 Transiente Expression der Austauschkonstrukte

Die Austauschkonstrukte F3ESLGWF, F3LSLGLF und F3HSLGHF (Abb. 2.23A) enthalten die gleichen flankierenden Sequenzen und die gleichen Kontrollelemente wie die Parentalkonstrukte. Zur Überprüfung der Funktionalität im transienten Status wurden je 2 µg der Konstrukte F3ESLGWF, F3LSLGLF und F3HSLGHF in je 5×10^4 CHO-K1-Zellen mittels Gene Porter-Transfektionsreagenz transfiziert und nach zwei Tagen die Luziferase- und eGFP-Expression gemessen. Als Vergleich für die Höhe der eGFP-Expression wurden ebenfalls die Parentalkonstrukte F3ESGTNWF und F3LSGTNLF transfiziert. Abb. 2.23B bestätigt die Funktionalität der Austauschkonstrukte. Sowohl eGFP als auch Luziferase werden transient exprimiert, die eGFP-Expression von F3ESLGWF und F3LSLGLF ist vergleichbar mit der Expression der Parentalkonstrukte. Die Expression des Insulator-flankierten Austauschkonstrukts ist etwas höher als die Expression der übrigen Konstrukte. Luziferase und eGFP werden in den Austauschkonstrukten äquivalent exprimiert. Somit konnten diese für den Kassettenaustausch verwendet werden.

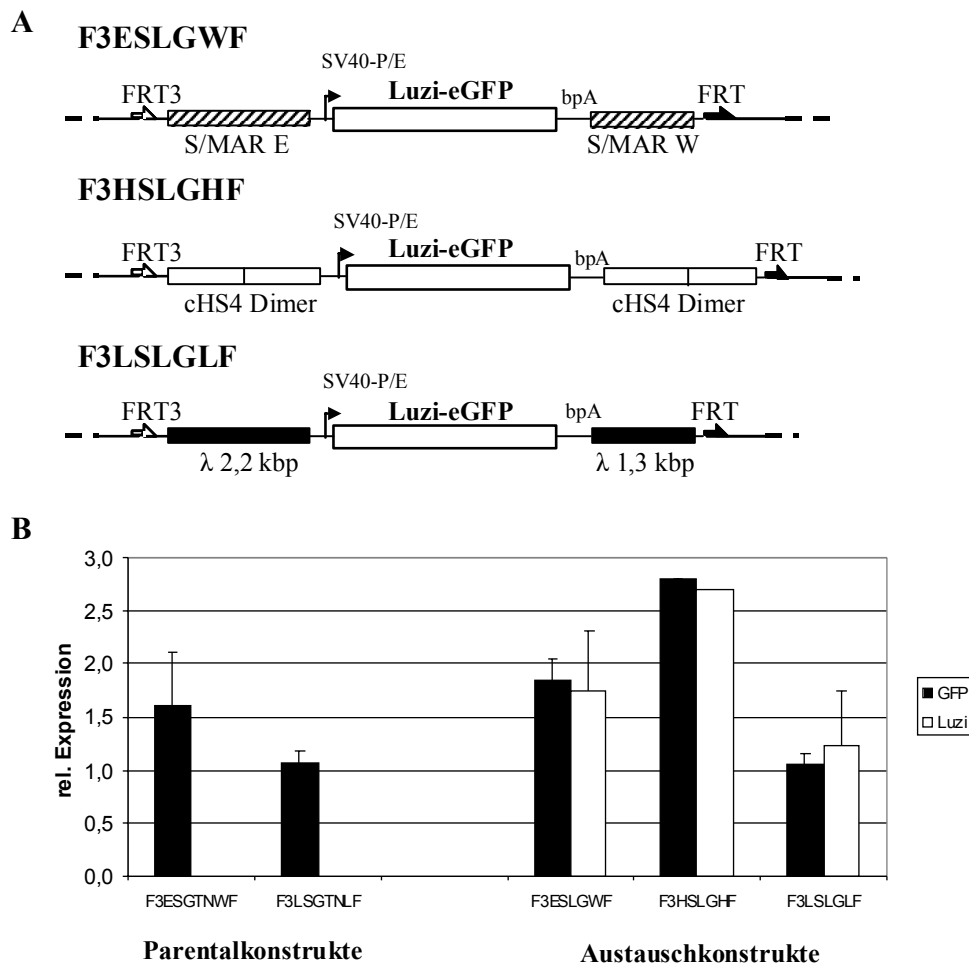


Abb. 2.23: Relative transiente Expression der Austauschkonstrukte im Vergleich zur transienten Expression der Parentalkonstrukte.

A: Schematische Darstellung der Austauschkonstrukte. Das Reporterfusionsgen Luzi-eGFP steht unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers und ist von den gleichen cis-agierenden Sequenzen und Kontrollelementen flankiert wie die Parentalkonstrukte. Die mittels RMCE auszutauschenden Kassetten sind von den heterospezifischen Rekombinaserkennungstellen FRT3 und FRT eingerahmt.

B: Dargestellt ist die relative transiente eGFP- und Luziferase-Expression als Mittelwert aus ein bis drei Messungen. Die schwarzen Balken symbolisieren die eGFP-Expression, die weißen Balken die Luziferase-Expression. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt. Die transiente Expression des Parentalkonstrukts F3HSGTNHF wurde im Rahmen dieser Messreihe nicht bestimmt.

2.3.4.2 Generierung der Austauschklone

Zunächst wurden für die Austauschreaktion aus den drei verschiedenen Klonserien je drei Klone mit unterschiedlichen Expressionseigenschaften ausgewählt. Die Klone S2.9, L2.59

und H2.13 haben eine niedrige Expression, die Klone S2.105, L2.48 und H2.113 sind Hochexprimierer, während die Klone S31, L4 und H52 Expressionsinaktivierung eines Teils der Zellen bei Langzeitkultivierung zeigen (siehe Abb. 2.21). Die Anreicherung des Austauschereignisses sollte über Negativselektion erfolgen. Hierbei wird Ganciclovir, das Substrat der Thymidinkinase, zu einem toxischen Produkt umgewandelt und Zellen, welche durch den Austausch das Fusionsgen GTN verloren haben, überleben die Selektion. Allerdings können die Zellen eine solche Resistenz auch spontan durch positionsabhängige Inaktivierung des *tk*-Gens erlangen (Askew et al., 1993; Wu et al., 1994, Seibler et al., 1998). Denkbar ist ebenfalls die Anreicherung von unspezifischen, vom Integrationsort abhängigen, Deletionsereignissen des Parentalkonstrukts. Die Klone wurden bis einen Tag vor der Transfektion in G418-haltigem Medium kultiviert, da gezeigt wurde, dass dies die Rate der Spontanresistenz verringert (Seibler et al., 1998).

Je 5×10^3 Zellen wurden mit $0,4 \mu\text{g}$ des Austauschplasmids und $0,6 \mu\text{g}$ des Plasmids Flpe (F. Stewart, Heidelberg) nach dem 'Gene Porter2'-Transfektionsprotokoll transfiziert. Das Plasmid Flpe enthält eine bezüglich ihrer Thermostabilität verbesserte Mutante der Flp-Rekombinase ('flp enhanced'; Buchholz et al., 1998) unter der Kontrolle des 'chicken β -actin'-Promotors und des CMV-Enhancers. Vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in einer Zahl von 1×10^4 pro 10 cm-Platte ausgesät und am fünften Tag wurde die Negativselektion mit Ganciclovir begonnen. Der selektionsfreie Zeitraum zwischen Transfektion und Beginn der Negativselektion ist notwendig, damit die Zellen, welche das Fusionsgen GTN verloren haben, keine restliche Thymidinkinase-Aktivität mehr aufweisen. Zur Kontrolle der Spontanresistenz wurden nicht transfizierte Zellen gleichermaßen ausgesät und selektiert. Nach acht bis neun Tagen bildeten sich Klone in einer Zahl von 0 bis 101 (Tab. 2.10). Die Klonzahlen auf den Kontrollplatten waren entweder ähnlich hoch wie die auf den Platten mit den transfizierten Zellen, was auf einen hohen Anteil spontanresistenter Klone schließen lässt, oder es konnten nach Negativselektion keine Klone generiert werden.

Einige der nach Transfektion entstandenen Klone wurden im Southern Blot hinsichtlich des Austauschereignisses untersucht (Daten nicht gezeigt). Wie anhand der Klonzahlen erwartet, konnte in keinem der Klone ein sequenzspezifischer Austausch nachgewiesen werden. Die meisten der analysierten Klone wiesen eine unspezifische Deletion oder Rearrangements des Parentalkonstrukts auf, andere besaßen dieses noch und müssen daher aufgrund einer transkriptionellen Inaktivierung des *tk*-Gens die Negativselektion überlebt haben.

Möglicherweise war ein ungünstiges Verhältnis von eingesetztem Rekombinase-exprimierendem Plasmid und Austauschplasmid die Ursache für das Ausbleiben der Austauschreaktion. Die Austauschkonstrukte sind mit einer Größe von 9,0 kbp bis 10,4 kbp verhältnismäßig groß. Daher wurde im folgenden das Verhältnis von Austausch- zu Rekombinaseplasmid erhöht. Es wurden 5 µg der Austauschplasmide und 1 µg des Rekombinase-exprimierenden Plasmids in 5×10^4 Zellen der in Tab. 2.11 aufgeführten Klone transfiziert. Bei diesem Versuchsansatz konnte nach Negativselektion eine höhere Anzahl von Klonen generiert werden, jedoch lagen auch hier mit Ausnahme von Klon S2.55 die Klonzahlen der Kontrollen in der gleichen Größenordnung wie die nach Transfektion erhaltenen, was auf einen hohen Anteil spontanresistenter Klone hindeutet. Eine Southern Blot Analyse bestätigte, dass kein Klon mit dem spezifischen Austauschereignis generiert wurde. Daher konnte nicht untersucht werden, ob die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften der S/MAR-Elemente auf einem transaktivierenden Einfluss oder einem Lokalisierungseffekt beruhen.

Klon	S31				S2.9				S2.105				L2.59				L2.48			
Austausch-konstrukt	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L
Klonzahl	-	-	-	-	-	1	-	-	66	74	101	95	-	-	-	-	5	8	8	1

Klon	L4				H52				H2.13				H2.113			
Austausch-konstrukt	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L
Klonzahl	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	-	2	7	5	3

Tab. 2.10: Klonzahlen nach Transfektion von Rekombinase-exprimierendem Plasmid und den verschiedenen Austauschkonstrukten im Verhältnis 3:2.

Es wurden 1×10^4 Zellen nach Transfektion ausgesät und mit Ganciclovir selektiert.

Klon	S2.55				S2.102				H33				H2.13				H2.113			
Austausch-konstrukt	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L	-	S	H	L
Klonzahl	15	50	50	>100	200	200	400	400	80	84	80	40	5	3	6	1	78	86	40	98

Klon	L4				L2.7			
Austausch-konstrukt	-	S	H	L	-	S	H	L
Klonzahl	-	-	-	-	38	60	42	68

Tab. 2.11: Klonzahlen nach Transfektion von Rekombinase-exprimierendem Plasmid und den verschiedenen Austauschkonstrukten im Verhältnis 1:5.

Es wurden 1×10^4 Zellen nach Transfektion ausgesät und mit Ganciclovir selektiert.

Ist die hohe Wahrscheinlichkeit, nach Negativselektion Klone mit inaktivierter Expression des Fusionsgens zu erhalten, auf eine hohe Halbwertszeit des Fusionsproteins zurückzuführen? EGFP ist sehr stabil (Li et al., 1998) und falls das Fusionsprotein ebenfalls sehr langlebig ist, wäre es denkbar, dass auch bei Beginn der Ganciclovir-Selektion fünf Tage nach dem Austausch noch Thymidinkinase-Aktivität vorhanden ist. So würden selektiv Zellen angereichert werden, die die Expression des Fusionsproteins GTN schon vor dem Austausch verloren haben. Ein Vergleich der Stabilität von GTN und eGFP zeigte jedoch, dass eGFP zehnmal stabiler als GTN ist. Nur in 3% GTN transient exprimierender Zellen konnte nach einer Woche das Protein noch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Somit sollte der Austausch prinzipiell über Negativselektion anzureichern sein. Im folgenden sollten verschiedene zusätzliche Ansätze zur Anreicherung des Austauschereignisses getestet werden.

2.3.4.3. Strategien zur Anreicherung des Austauschereignisses

In den bisherigen Ansätzen beruhte die Anreicherung allein auf Negativselektion. Da so auch die Klone angereichert werden, welche die *tk*-Expression durch Deletion oder transkriptionelle Inaktivierung verloren haben, ist es aufwändig, vor diesem Hintergrund Klone mit dem spezifischen Austauschereignis zu identifizieren. Die Transfektionseffizienz konnte zwar durch das ‘Gene-Porter’-Transfektionsprotokoll auf maximal 30% optimiert werden (Daten nicht gezeigt), dennoch wäre es günstig, erfolgreich transfizierte Zellen anreichern zu können. In einer früheren Arbeit konnte in der Zelllinie NIH 3T3 der Anteil falsch positiver Klone nach Negativselektion durch FACS-Sortierung reduziert werden (Seibler, 1999). Hier wurde, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, ein für die F₁p-Rekombinase und GFP kodierendes Plasmid verwendet und erfolgreich transfizierte Zellen wurden durch FACS-Sortierung angereichert. Diese Strategie kann im Rahmen dieses Konzepts nicht angewendet werden, da die Parentalklone bereits eGFP exprimieren. Daher wurden alternative Anreicherungsstrategien untersucht.

Zunächst wurde versucht, eine Anreicherung mithilfe des ‘Rot-fluoreszierenden Proteins’ vorzunehmen. Dieses kann ebenso wie eGFP bei einer Wellenlänge von 489 nm angeregt werden. Sein Emissionsmaximum liegt bei 583 nm, daher kann es bei FACS-Analysen gut

von eGFP unterschieden werden, welches Licht einer Wellenlänge von 508 nm emittiert. Das 'Rot-fluoreszierende Protein' aus dem Vektor pDSRed1-N1 (Clontech) unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers wurde mit dem Flpe-Gen fusioniert, um ein Plasmid zu erhalten, welches für beide Funktionen kodiert. Da die Expression des Fusionsgens aus unbekannten Gründen nur ein Zehntel der Expression des 'Rot-fluoreszierenden Proteins' im Ursprungsvektor betrug (Daten nicht gezeigt) und somit für eine FACS-Sortierung zu gering war, konnte dieser Ansatz für die Anreicherung transfizierter Zellen nicht genutzt werden.

Eine weitere Möglichkeit, transfizierte Zellen anzureichern, bietet die magnetische Sortierung. Hierzu wurde der Vektor pMACS K^k.II (Miltenyi Biotech) verwendet. Er kodiert für das H-2K^k-Oberflächenantigen unter der Kontrolle des H-2K^k-Promotors, welcher Hochexpression in den meisten Säugerzelllinien gewährleistet. Das H-2K^k-Oberflächenantigen bindet Eisenionen, welche sich im Kulturmedium der Zellen befinden. So können exprimierende Zellen über eine in einem Magnetfeld befindliche Säule abgetrennt werden. Das Flpe-Gen wurde in den Vektor pMACS K^k.II hinter den SV40-Promotor/Enhancer eingebracht. Zunächst musste sichergestellt werden, dass in dem derart konstruierten Plasmid pMACSFlpe beide Gene in ausreichendem Maß exprimiert werden. Eine Antikörperfärbung nach Transfektion in CHO-K1-Zellen zeigte, dass der Vektor pMACSFlpe das H-2K^k-Oberflächenantigen vergleichbar mit dem Ursprungskonstrukt pMACS K^k.II exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ein Versuch der Anreicherung in der BHK-A Testzelllinie R3 (Schübeler et al., 1998), bei der durch Rekombinaseaktivität ein *lacZ*-Gen unter die Kontrolle eines retroviralen LTRs gerät (Abb. 2.24A), zeigte, dass nach magnetischer Sortierung die Rekombinaseaktivität des Plasmids pMACSFlpe um den Faktor 2,6 angereichert werden konnte. Jedoch wurde die gleiche Exzisionseffizienz durch Transfektion mit dem Vektor Flpe erreicht, der eine höhere Rekombinase-Aktivität besitzt (Abb. 2.24B). Somit konnte auch durch den Versuch der magnetischen Sortierung keine Anreicherung der Rekombinaseaktivität erzielt werden. Im folgenden soll untersucht werden, ob ein Austausch in CHO-K1-Zellen durch Verwendung zweier Anreicherungsstrategien grundsätzlich möglich ist.

2.3.5 Bewertung des Austauschsystems und alternative Austauschstrategien

In den charakterisierten Einzelkopieklonen ist die Anreicherung des Kassettenaustausches durch reine Negativselektion aufgrund einer hohen Spontanresistenz der CHO-K1-Zelllinie

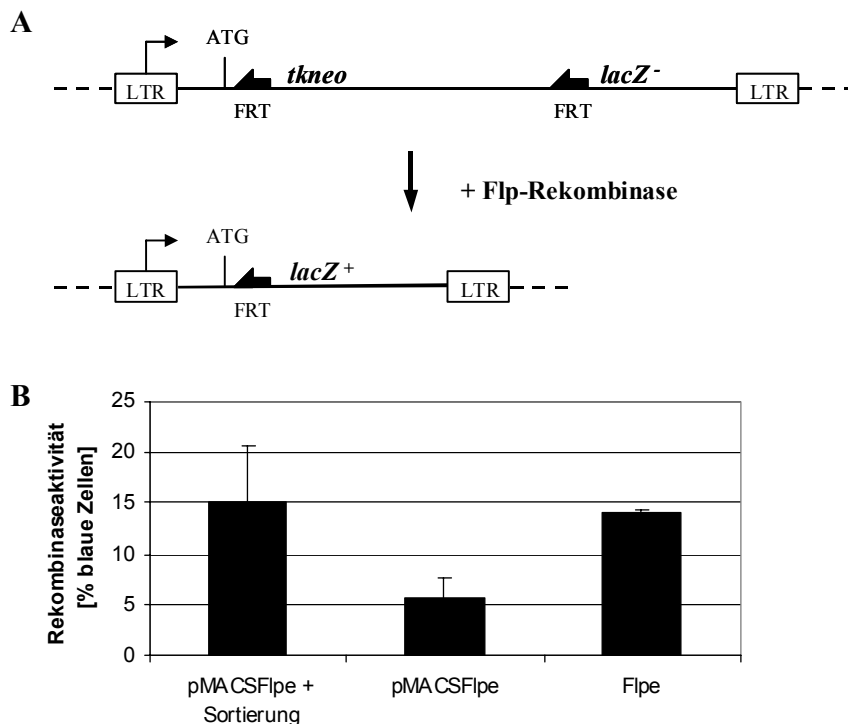


Abb. 2.24: Anreicherung der Rekombinaseaktivität über magnetische Sortierung.

A: Schematische Darstellung des Testsystems. Die Zelllinie BN-R3 trägt eine Kopie eines Provirus, in dem ein von FRT-Sites flankiertes *tkneo*-Fusionsgen vom viralen LTR aus transkribiert wird. Durch Rekombinaseaktivität wird das *tkneo*-Gen exzidiert und das defiziente *lacZ*-Gen (*lacZ*⁻) gerät in den Leserahmen des *tkneo*-Gens unter die Kontrolle des viralen LTRs (*lacZ*⁺). Diese Zellen werden durch X-Gal-Färbung blau gefärbt.

B: Rekombinaseaktivität des Plasmids pMACSFlpe mit und ohne magnetische Sortierung im Vergleich zur Aktivität des Plasmids Flpe. Die magnetische Sortierung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion, die X-Gal-Färbung 72 Stunden nach der Transfektion. Die Rekombinaseaktivität ist als prozentualer Anteil blauer Zellen der Zelllinie BN-R3 angegeben. Die Balken stellen den Mittelwert aus drei Messungen dar. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator oberhalb der Balken angezeigt.

nicht möglich. Da es wünschenswert ist, RMCE in CHO-Zellen aufgrund ihrer biotechnologischen Relevanz durchführen zu können, soll im folgenden überprüft werden, ob der Kassettenaustausch in dieser Zelllinie durch parallele Ausführung zweier Anreicherungsstrategien prinzipiell möglich ist. Ein weiterer Nachteil des beschriebenen Systems ist der hohe Screeningaufwand zur initialen Generierung der Parentalklone: um festzustellen, ob Klone für den RMCE potenziell nutzbar sind, müssen zunächst die Kopienzahl, die Intaktheit des Transgens inklusive der flankierenden FRT-Sites und die Spontanresistenz bestimmt werden. Daher wäre es günstig, zunächst einen Austausch an Klongemischen durchzuführen. Die so erhaltenen Klone mit dem korrekten Austauschereignis

sollten eine hohe Wahrscheinlichkeit der intakten Integration einer Kopie des Transgens besitzen und prinzipiell auch für weitere Austausche nutzbar sein.

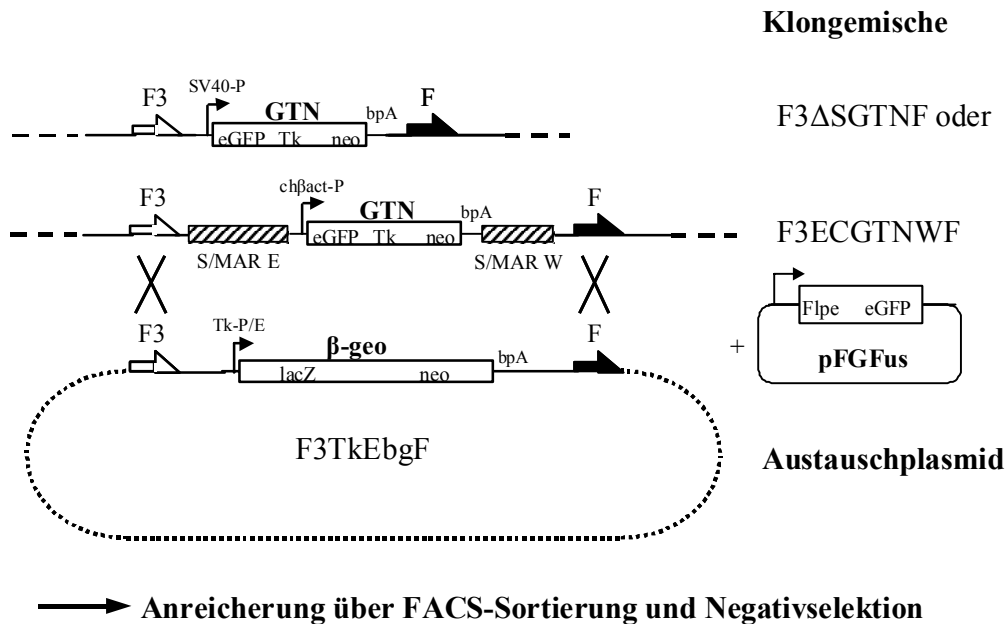
Im folgenden wurde durch einen Vorversuch überprüft, ob ein Kassettenaustausch unter Verwendung zweier Anreicherungsstrategien in Klongemischen durchgeführt werden kann. Ein Schema des Austausches ist Abb. 2.25A zu entnehmen. Die Anreicherung sollte zum einen über Negativselektion mit Ganciclovir auf den Verlust der Expressionskassette GTN hin erfolgen und zum anderen sollte über FACS-Sortierung auf den erfolgreichen Transfer des Rekombinase-exprimierenden Plasmids pFGFus angereichert werden. Dieses Plasmid exprimiert ein Fusionsprotein aus der Flpe-Rekombinase und eGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers (Jost Seibler, unveröffentlicht). Daher mussten Klongemische mit einer sehr niedrigen eGFP-Expression verwendet werden, welche von der transienten Expression des Plasmids pFGFus im FACS zu trennen ist. Der Austausch wurde in zwei verschiedenen stabilen Gemischen durchgeführt. Zum einen wurde das Gemisch verwendet, welches nach Elektroporation mit dem Vektor F3ΔSGTNF generiert wurde, in dem der SV40-Enhancer deletiert ist (siehe Kap. 2.3.6), zum anderen ein Klongemisch, welches nach Elektroporation mit dem Konstrukt F3ECGTNWF erhalten wurde. In diesem Vektor steht das Fusionsgen GTN unter der Kontrolle des ‘chicken β -actin’-Promotors und ist flankiert von den S/MAR-Elementen E und W. Die eGFP-Expression beider Klongemische liegt nur geringfügig über der Expression von Wildtyp-CHO-K1-Zellen (Abb. 2.25B). Das Austauschplasmid F3TkEbgF (Jost Seibler, unveröffentlicht) enthält den gleichen Satz an FRT-Sites wie die Konstrukte in den Klongemischen. Sie flankieren das Fusionsgen β -geo (siehe Kap. 2.2.1) unter der Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors und des Polioma-Enhancers. Der *lacZ*-Anteil dient der Detektion von Zellen, welche das Plasmid integriert haben. Der *neo^r*-Anteil wird in diesem Versuchsansatz nicht benötigt.

Vor dem Austausch wurde die Spontanresistenz der Gemische bestimmt. Sie lag bei Negativselektion mit einer Ganciclovir-Konzentration von 20 μ M bei 0,08% für das F3ΔSGTNF-Gemisch, welches eine niedrigere Expression des Fusionsgens und somit auch der Thymidinkinase aufweist, und bei 0,04% für das F3ECGTNWF-Gemisch und war somit vergleichbar mit der Spontanresistenz der in Kap. 2.3.4.2 untersuchten Einzelkopieklone. Für den Austausch wurden in je 5×10^4 Zellen beider Klongemische 1 μ g des Rekombinase-plasmids pFGFus und 4 μ g des Austauschplasmids F3TkEbgF nach dem ‘Gene Porter 2’-Transfektionsprotokoll transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die

transfizierten Gemische im FACS sortiert. Abb. 2.25B zeigt die FACS-Analysen der transfizierten und nicht transfizierten Gemische als Dot Plot. Von dem F3ΔSGTNF-Gemisch wurden 1500 Zellen aus dem Fenster R5 auf eine 10cm-Platte sortiert und von dem F3ECGTNWF-Gemisch 1200 Zellen. Es fällt auf, dass die nicht eGFP-exprimierenden Zellen der transfizierten Gemische eine höhere Expression als die Zellen der nicht transfizierten Kontrollgemische besitzen. Dies ist dadurch zu erklären, dass nach Transfektion mit dem 'Gene Porter 2'-Transfektionsreagenz CHO-K1-Zellen grundsätzlich eine geringfügige reversible Expressionserhöhung zeigen (Daten nicht gezeigt). Die Negativselektion mit 20 µM Ganciclovir begann vier Tage nach der Sortierung. Nach drei Tagen wurde bei einigen Klonen die Wirkung der Negativselektion sichtbar. Die Thymidinkinase-exprimierenden Klone stellen die Zellteilung ein und haben eine veränderte Zellmorphologie mit länglichen Ausläufern und vergrößerten Zellkernen. Acht Tage nach der Negativselektion wurden die Platten mit dem Reagenz X-Gal angefärbt, welches in β-Galaktosidase-exprimierenden Zellen zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Um die Effizienz des Austausches zu ermitteln, wurde die Anzahl blauer und weißer Klone bestimmt. Die Gesamtzahl der ausgezählten Klone betrug 227 für das F3ΔSGTNF-Gemisch und 181 für das F3ECGTNWF-Gemisch.

Neben komplett blauen und weißen Klonen waren in beiden Gemischen auch Klone mit sowohl blauen als auch weißen Zellen vorhanden. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen in diesen Mosaik-Klonen einem stochastischen positionsabhängigen Inaktivierungsprozess der Expression unterliegen, der sowohl in Zellkultur (Conklin und Groudine, 1986; Davies et al., 1982) als auch in transgenen Mäusen (Dobie et al., 1997) beobachtet wurde. Tab. 2.12 sind die absoluten Klonzahlen sowie die prozentualen Anteile an der Gesamtheit der Ganciclovir-resistenten bzw. -sensitiven Klonen zu entnehmen. Bei den weißen Ganciclovir-sensitiven Klonen handelt es sich um spontanresistente Klone oder um Austauschklone mit kompletter Inaktivierung der Expression. Der höhere Anteil spontanresistenter Klone im F3ΔSGTNF-Gemisch wurde bereits in einem Vorversuch festgestellt (siehe oben). Die Ganciclovir-resistenten blau oder mosaik gefärbten Klone besitzen entweder den sequenzspezifischen Austausch oder sind spontanresistente Klone mit zufälliger Integration des Austauschplasmids. Anhand der gefärbten Ganciclovir-sensitiven Klone lässt sich ablesen, dass die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Integration bei 17% bzw. 15% liegt, also deutlich geringer ist als der Prozentsatz potenzieller Austauschklone. Rechnet man den Anteil der unspezifischen Integration in den Anteil der potenziellen Austauschklone ein, so ergibt

A



B

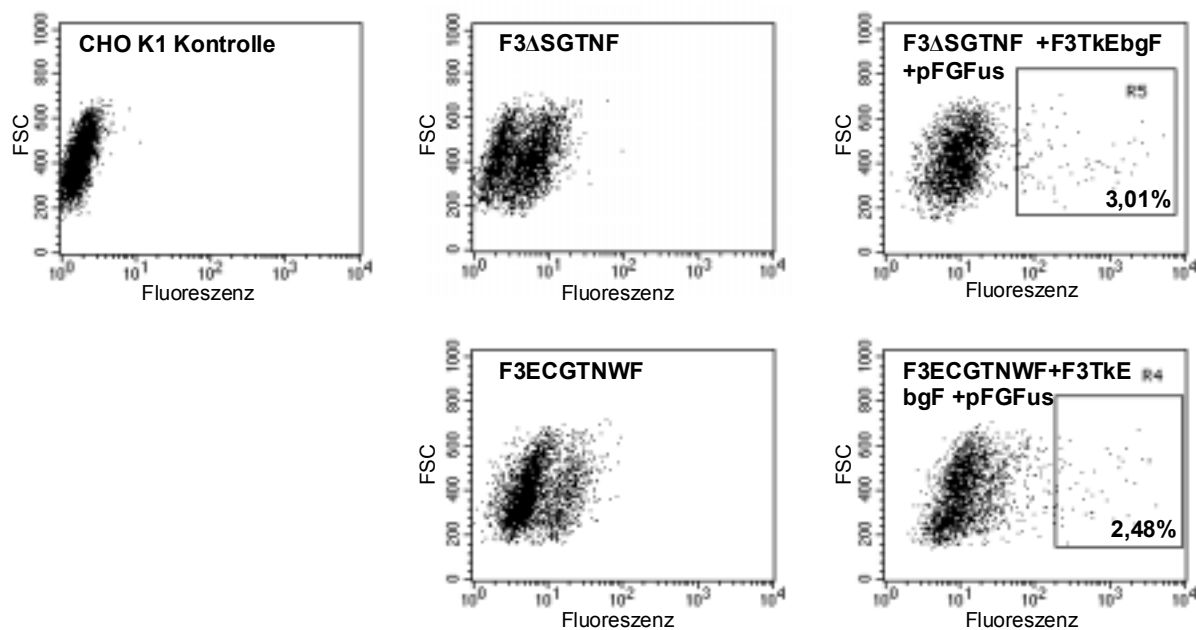


Abb. 2.25: Kassettenaustausch im Klongemisch.

A: Schematische Darstellung des Austausches. Nach Transfektion des Austauschplasmids F3TkEbgF und des Rekombinaseplasmids pFGFus, welches eine Fusion aus Flpe und eGFP exprimiert, soll das Austauschereignis in den Klongemischen über FACS-Sortierung und Negativselektion angereichert werden.

B: FACS-Sortierung zur Anreicherung des Austauschereignisses. Die Expression von CHO-K1-Wildtypzellen sowie die der untransfizierten und transfizierten Gemische ist als Dot-Plot-Auftragung dargestellt. FSC ('forward scatter') = Zellgröße. Bei den mit pFGFus transfizierten Gemischen zeigen die Fenster R5 und R4 den Expressionsbereich der sortierten Zellen an. Die Zahlen in den Fenstern geben den Prozentsatz der in diesem Bereich liegenden Zellen an.

sich für das F3ΔSGTNF-Gemisch eine Austauschfrequenz von 35% und für das F3ECGTNWF-Gemisch von 56%. Diese Werte zeigen, dass RMCE im Klongemisch unter Verwendung zweier Anreicherungsstrategien prinzipiell durchführbar ist, müssten jedoch durch Analyse der integrierten Transgene belegt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurde. Im Rahmen der Diskussion sollen weitere RMCE-Ansätze und Anreicherungsstrategien erörtert werden.

Gemisch	Ganc resistente Klone				Ganc sensitive Klone			
	blau	weiß	mosaik	Σ	blau	weiß	mosaik	Σ
F3ΔSGTNF	45 24%	108 58%	33 18%	186 100%	7 17%	34 83%	0 0%	41 100%
F3ECGTNWF	41 29%	48 34%	51 37%	140 100%	0 0%	35 85%	6 15%	41 100%

Tab. 2.12: β -Galaktosidase-Expression Ganciclovir-resistenter und -sensitiver Klone nach Austausch in zwei Gemischen.

Anhand der Färbung der Klone kann die Effizienz des Austausches abgeschätzt werden. Es sind die absoluten Klonzahlen und darunter der Anteil innerhalb der Ganciclovir-resistenten und -sensitiven Klone des jeweiligen Gemisches angegeben (dick gedruckt).

2.3.6 Einfluss des SV40-Enhancers auf die Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren in Klongemischen

In Kap. 2.3.3 wurde die Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren auf die Expression des Fusionsgens GTN unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers in Einzelkopieklonen untersucht. Im Vergleich zu den Lambda-flankierten Kontrollklonen zeigte sich, dass die S/MAR-Elemente die Expressionshöhe durchschnittlich um den Faktor 1,5 erhöhen und die cHS4-Insulator-Sequenzen um den Faktor 2,1. Allerdings konnten keine eindeutigen Einflüsse bezüglich der Langzeitstabilität der Expression nachgewiesen werden. Der Anteil der Klone, welche Expressionsverlust zeigten, sowie das Ausmaß der Inaktivierung waren relativ gering. Ein Grund hierfür könnte die Anwesenheit des starken SV40-Enhancers sein. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Enhancer der Expressionsinaktivierung entgegenwirken (Walters et al., 1996; Francastel et al., 1999). Möglicherweise hätte ohne Enhancer ein größerer Anteil der Klone die Expression verloren,

was eine genauere Untersuchung der Wirkung der flankierenden Elemente auf die Inaktivierung ermöglicht hätte. Daher sollte im folgenden der Einfluss der S/MARs und Insulatoren auf die Langzeitstabilität in Abwesenheit des Enhancers untersucht werden. Desgleichen sollte ebenfalls überprüft werden, ob der SV40-Enhancer die transkriptionsfördernde Wirkung der S/MARs und Insulatoren beeinflusst.

Hierzu wurden in den Parentalkonstrukten (Abb. 2.14) die zwei 72bp ‘repeats’ und die drei 21bp ‘repeats’ des SV40-Enhancers 5’ der TATA-Box deletiert (Abb.2.26). Die transiente eGFP-Expression der vier derart generierten Enhancer-freien Konstrukte war nahezu identisch und durchschnittlich siebenfach geringer als die Expression der Konstrukte mit SV40-Enhancer (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkung der S/MAR-Elemente und Insulatoren auf die Höhe und Stabilität der Expression in An- und Abwesenheit des Enhancers sollte in Klongemischen der Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 untersucht werden.

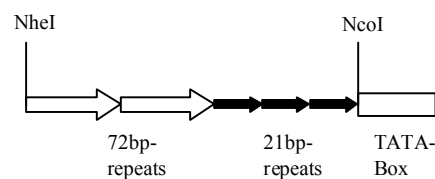


Abb. 2.26: Schema der Deletion des SV40-Promotor/Enhancers.

Die Deletion der zwei 72bp ‘repeats’ und der drei 21bp ‘repeats’ stromaufwärts der TATA-Box erfolgte durch Herausschneiden mit den Enzymen *NheI* und *NcoI*, Auffüllen und Religation.

2.3.6.1 Einfluss auf die Expressionshöhe

Zunächst sollte überprüft werden, ob der SV40-Enhancer die S/MAR- bzw. Insulator-Wirkung auf die Expressionshöhe in Klongemischen beeinflusst. Hierbei sollte zum einen der Einfluss auf die Klonzahlen als Maß für die Neomycinphosphotransferaseaktivität und zum anderen der Einfluss auf die eGFP-Expression bestimmt werden. Für die Anlage der Klongemische wurden je 0,75 µg der Konstrukte mit flankierenden S/MAR-, Lambda- und Insulator-Sequenzen sowie das Grundkonstrukt ohne flankierende Elemente jeweils mit und ohne SV40-Enhancer in 1×10^6 CHO-K1- und NIH-3T3-Zellen elektroporiert. Nach Selektion mit G418 wurden die Klonzahlen bestimmt, welche Abb. 2.27A zu entnehmen sind. In beiden Zelllinien wurden in Anwesenheit des SV40-Enhancers geringfügig höhere Klonzahlen mit

den S/MAR- und den Insulator-haltigen Konstrukten im Vergleich zur Lambda-Kontrolle erzielt. In Abwesenheit des Enhancers hingegen steigern die S/MAR-Elemente verglichen mit den Lambda-flankierten Konstrukten in CHO-K1-Zellen die Klonzahl um den Faktor 3,3. Die cHS4-Insulatoren erhöhen in diesem Fall die Klonzahl nur geringfügig. In der Zelllinie CHO K1 steigert die Flankierung der Expressionskassette generell die Klonzahl im Vergleich zur nicht flankierten Kontrolle. Offensichtlich wird so die Wahrscheinlichkeit der Expression durch Abschirmung von reprimierenden Chromatinsequenzen erhöht. Dies bestätigt die Notwendigkeit der Verwendung von flankierenden Kontrollsequenzen in diesem System. Dieser Effekt ist auch in NIH-3T3-Zellen in Anwesenheit des Enhancers zu beobachten. In Abwesenheit des Enhancers allerdings werden in dieser Zelllinie die höchsten Klonzahlen mit dem Insulator-haltigen Konstrukt erzielt.

Im folgenden sollte überprüft werden, ob die anhand der Klonzahlbestimmung festgestellten Effekte der verschiedenen cis-agierenden Elemente durch die Messung der eGFP-Expressionshöhe im FACS bestätigt werden können. Die Messung wurde an Klöngemischen durchgeführt, welche aus mindestens 78 Klonen bestanden. Im Falle der Enhancer-deletierten Konstrukte in NIH 3T3 enthielten die Gemische elf bis 37 Klone. Insgesamt war die Expression der Enhancer-losen Konstrukte im Vergleich zu den Konstrukten mit SV40-Enhancer drei bis zwölf mal geringer (Daten nicht gezeigt).

In CHO-K1-Zellen konnten die Ergebnisse der Klonzahlbestimmung weitestgehend bestätigt werden (Abb. 2.27B). In Anwesenheit des Enhancers steigern die S/MAR-Elemente im Vergleich zur Lambda-Kontrolle die Expression um den Faktor 2,6, die Insulatoren um den Faktor 3. Allerdings ist in diesem Fall die Expression des unflankierten Grundkonstrukts höher als die des Lambda-Kontrollkonstrukts. Offensichtlich ermöglicht die Flankierung mit Lambda-Sequenzen zunächst die Transkription in einer größeren Anzahl von Klonen durch Abschirmung, die Expressionshöhe wird aber in diesem Kontext leicht reprimiert. In Abwesenheit des Enhancers konnte der schon bei den Klonzahlen beobachtete S/MAR-Effekt bestätigt werden. Die Flankierung mit den S/MAR-Elementen E und W steigert die eGFP-Expressionshöhe um den Faktor 3,8 verglichen mit der Lambda-Kontrolle.

In NIH-3T3-Zellen waren keine deutlichen Einflüsse der unterschiedlichen Konstrukte auf die Expressionshöhe des Reporters eGFP zu verzeichnen. Offensichtlich erhöht in Anwesenheit des Enhancers die Flankierung mit einem 'Spacer' grundsätzlich die Klonzahl, nicht aber die eGFP-Expressionshöhe. Auch haben in Abwesenheit des Enhancers die cHS4-Insulatoren

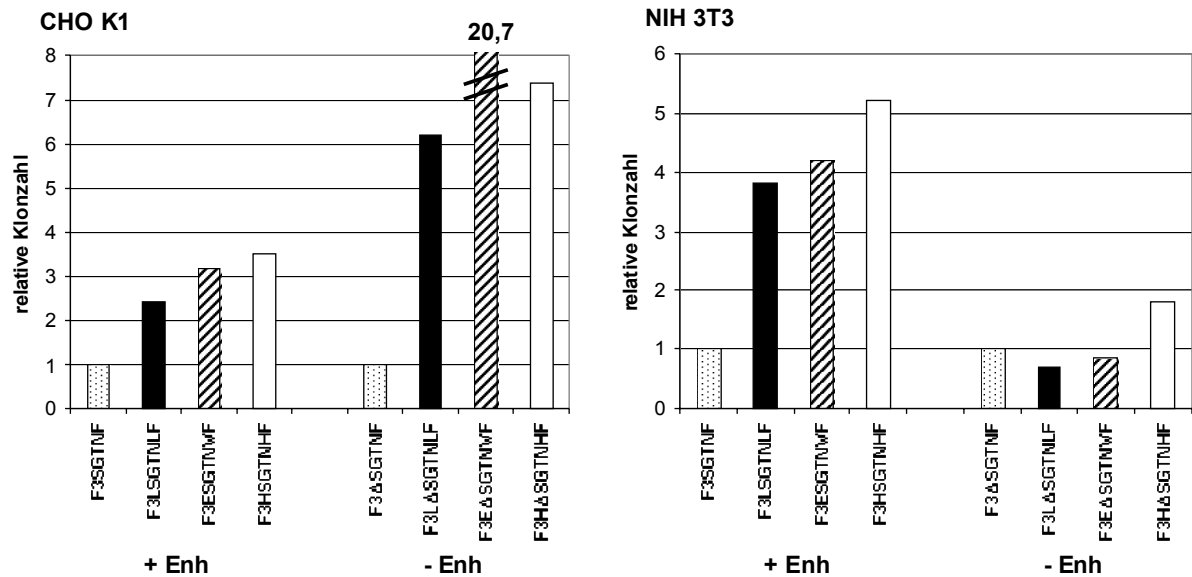
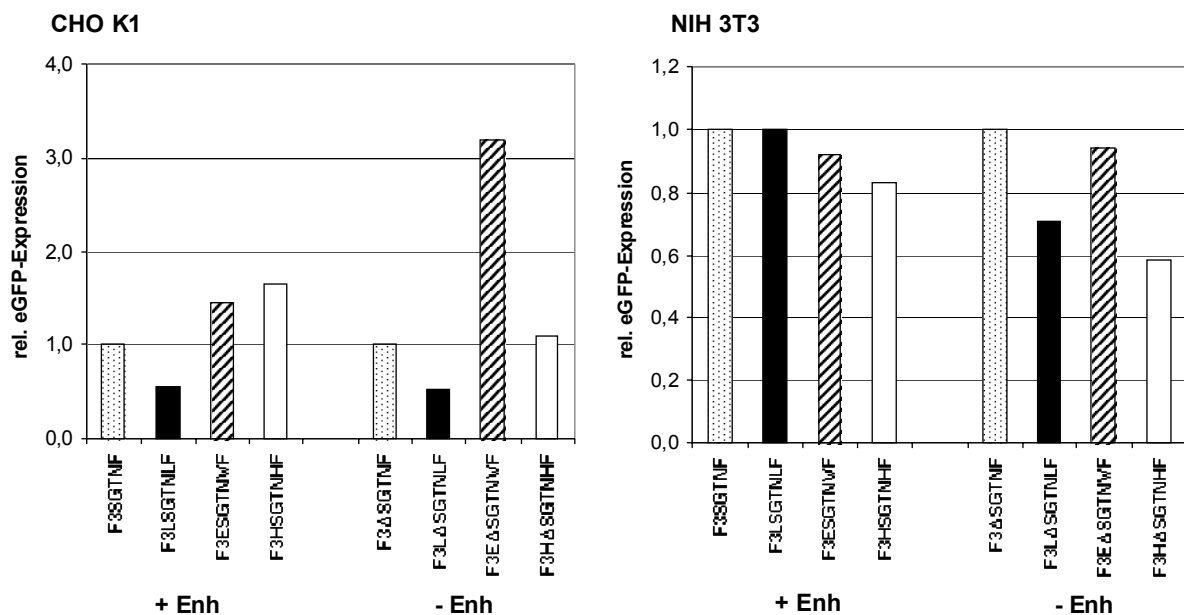
A Klonzahlen**B eGFP-Expression**

Abb. 2.27: Einfluss des SV40-Enhancers auf die Expressionshöhe der Konstrukte mit verschiedenen flankierenden Elementen.

Es wurden die relativen Klonzahlen (A) und die relative eGFP-Expression (B) in An- und Abwesenheit des Enhancers in CHO-K1- und NIH-3T3-Zellen bestimmt. Die gepunkteten Balken stehen für die Expression der Grundkonstrukte ohne flankierende Elemente, die gestreiften für die S/MAR-flankierten Konstrukte, die schwarzen für die Lambda-flankierten und die weißen für die cHS4-flankierten Konstrukte. Die relative Expression ist jeweils im Verhältnis zur Expression des Grundkonstrukts angegeben, welche auf 1 gesetzt ist.

eine positive Wirkung auf die Klonzahl, aber nicht auf die eGFP-Expression.

Ein positiver Effekt der S/MAR- und Insulator-Elemente auf die Höhe der eGFP-Expression

war also nur in der Zelllinie CHO K1 zu beobachten. Hierbei war die Steigerung der Expression durch die S/MAR-Elemente deutlicher in Abwesenheit des Enhancers. Die Expressionssteigerung bei Flankierung der Expressionskassette mit den cHS4-Insulatoren war stärker in Anwesenheit des Enhancers.

Da bekannt ist, dass Enhancer die Langzeitexpression stabilisieren, sollte im folgenden überprüft werden, ob die Klongemische in Abwesenheit des Enhancers die Expression verlieren und dieser Vorgang durch die flankierenden Elemente beeinflusst wird.

2.3.6.2 Einfluss auf die Stabilität der Expression

Für die Überprüfung der Wirkung der cis-agierenden Elemente auf die Langzeitstabilität der Expression in An- und Abwesenheit des Enhancers wurden die Gemische über 22 Passagen mit und ohne G418 kultiviert und die Messung der eGFP-Expression erfolgte in regelmäßigen Abständen im FACS. Die CHO-K1-Gemische mit SV40-Enhancer wurden 50 Passagen lang kultiviert. Von den NIH-3T3-Gemischen ohne Enhancer wurde keine Stabilitätsüberprüfung vorgenommen, da die Expression zu gering war, um einen Expressionsverlust feststellen zu können.

Aus den Histogram-Plots in Abb. 2.28 wird ersichtlich, dass die Auswirkung der S/MAR-Elemente und der Insulatoren auf die Stabilität der Expression ebenso wie die Höhe von der Präsenz des Enhancers und der Zelllinie abhängt. In CHO-K1-Zellen besitzen die Gemische mit Lambda- und cHS4-Flankierung hohe Langzeitstabilität, während die S/MAR-Elemente den Expressionsverlust eines Teils der Zellen fördern. Beim unflankierten Kontrollgemisch dagegen ist in Abwesenheit von Selektionsdruck keine komplette Inaktivierung der Expression eines Teils der Zellen sondern eine Expressionserniedrigung des gesamten Gemisches zu erkennen. In Abwesenheit des Enhancers hingegen ergeben sich in der gleichen Zelllinie gegenteilige Effekte. Bei allen Gemischen mit flankierenden Elementen ist eine Inaktivierung der Expression eines Teils der Zellen bei Kultivierung ohne Selektionsdruck zu beobachten. Jedoch ist diese bei den S/MAR-Gemischen deutlich geringer als bei dem Lambda-Kontroll- und dem Insulator-Gemisch. Das Gemisch ohne flankierende Elemente zeigt keine Inaktivierung der Expression, allerdings ist hier die Expressionshöhe sehr gering. In NIH-3T3-Zellen mit Enhancer haben die S/MAR-Elemente die stärkste

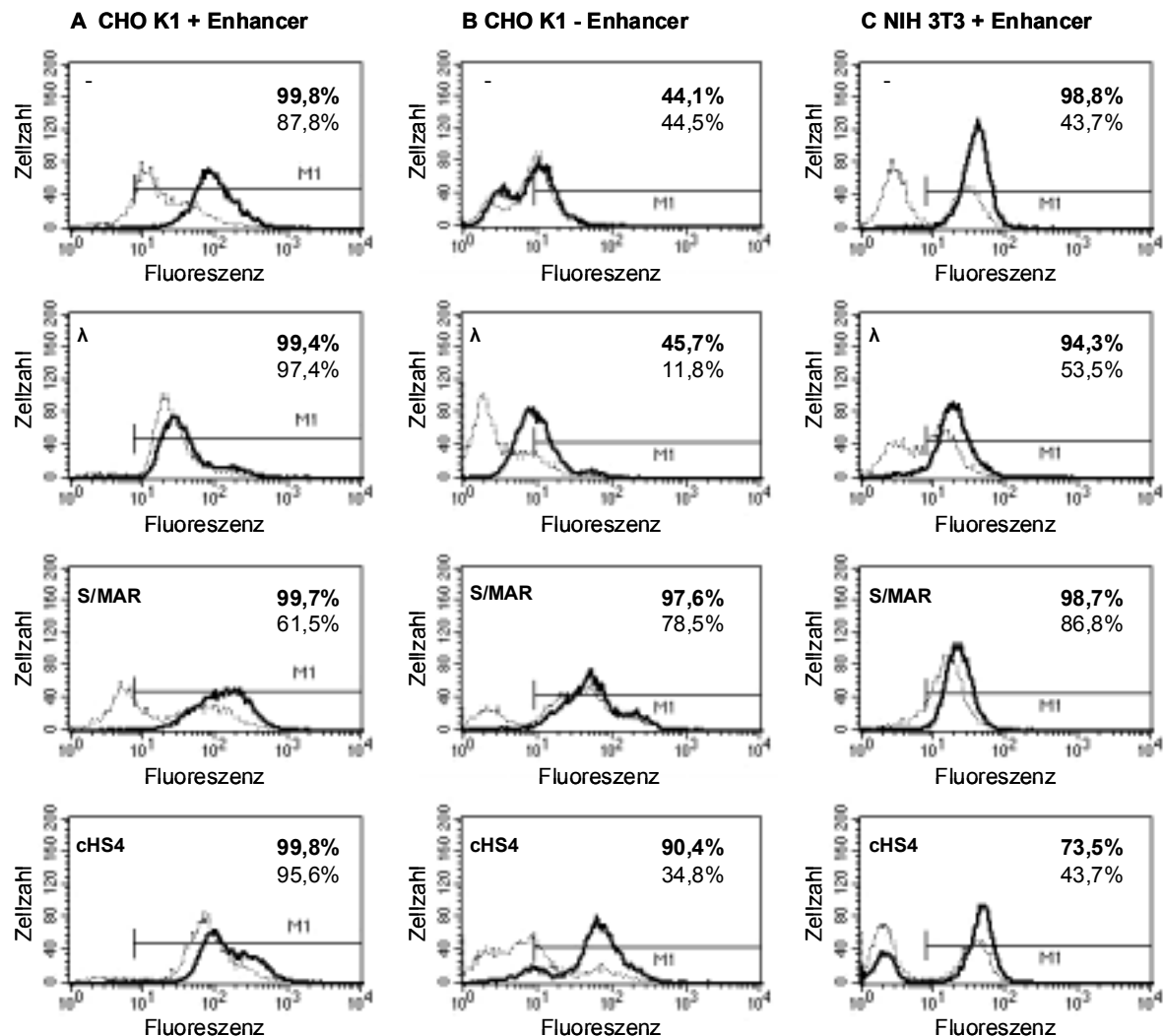


Abb. 2.28: Expressionstabilität von Klongemischen mit unterschiedlichen flankierenden Elementen in An- und Abwesenheit des SV40-Enhancers.

Gezeigt sind Histogramm-Plots von Gemischen, welche über 22 bzw. 50 Passagen (CHO K1 + Enhancer) mit und ohne Selektionsdruck kultiviert wurden. Die Zellzahl ist gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Das Expressionsprofil der Gemische, welche unter Selektionsdruck gehalten wurden, ist als dicke Linie dargestellt. Die dünne gestrichelte Linie symbolisiert das Expressionsprofil der in Abwesenheit von G418 kultivierten Zellen. Die Grenze M1 markiert den Bereich exprimierender Zellen. Sie wird festgelegt durch die Expressionshöhe, welche in der CHO-K1-Wildtyp-Kontrolle (nicht gezeigt) 1% der Zellen überschritten haben. Der Anteil der unter Selektionsdruck gehaltenen Zellen in M1 ist fett gedruckt, der Anteil der ohne Selektionsdruck gehaltenen Zellen in M1 ist dünn gedruckt. Die flankierenden Elemente sind in der linken oberen Ecke der Histogramme angegeben.

expressionsstabilisierende Wirkung. Alle anderen Gemische zeigen deutliche Inaktivierung der Expression. Auffällig ist hier, dass das cHS4-Gemisch auch bei Kultivierung unter Selektionsdruck ein biphasisches Expressionsprofil besitzt. Dies war bereits zu Beginn der

Kultivierung der Fall (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich reicht eine sehr niedrige Expression des Fusionsgens, bei der die eGFP-Expressionshöhe der von Wildtyp-Zellen entspricht, für das Überleben der Selektion aus.

Die Langzeitkultivierung zeigte also, dass die S/MAR-Elemente E und W in NIH-3T3-Zellen in Anwesenheit des Enhancers und in CHO-K1-Zellen in Abwesenheit des Enhancers die Expression stabilisieren. Im Gegensatz dazu fördern sie in CHO-K1-Zellen in Anwesenheit des Enhancers die Inaktivierung der Expression. Die cHS4-Insulatoren ermöglichen nur bei Präsenz des Enhancers in der Zelllinie CHO K1 eine stabile Expression.

Insgesamt belegen die an den Klongemischen durchgeführten Expressionsanalysen eindeutig, dass die cis-agierende Wirkung von S/MAR-Elementen und Insulatoren von der Anwesenheit des SV40-Enhancers und von der Zelllinie abhängig ist. Der deutlichste cis-agierende Einfluss der S/MAR-Elemente wurde in CHO-K1-Zellen in Abwesenheit des Enhancers beobachtet. Hier hat die Flankierung der Expressionskassette mit den S/MAR-Elementen E und W einen positiven Effekt sowohl auf die Klonzahl als auch auf die Höhe und die Stabilität der eGFP-Expression. Auch in NIH-3T3-Zellen wird der Inaktivierung der Expression deutlich durch die S/MAR-Elemente entgegengewirkt, allerdings in Anwesenheit des Enhancers. Dieser Effekt konnte in dieser Zelllinie auch schon im Rahmen des Exzisionskonzepts beobachtet werden (Kap. 2.2.3.4). Im Gegensatz hierzu fördern in CHO-K1-Zellen die S/MAR-Elemente in Anwesenheit des Enhancers die Inaktivierung der Expression. Dies wurde auch bei der Analyse der Einzelkopieklone mit dem Konstrukt F3ESGTNWF in Kap. 2.3.3.4 festgestellt. Auf mögliche Gründe hierfür soll im Rahmen der Diskussion näher eingegangen werden. Im gleichen Klongemisch allerdings konnte bezüglich der Höhe der eGFP-Expression wiederum eine Aktivierung beobachtet werden. Die stärksten aktivierenden Effekte der Insulatoren auf die Höhe der eGFP-Expression sind in CHO-K1-Zellen in Anwesenheit des Enhancers und auf die Klonzahl in NIH-3T3-Zellen ohne Enhancer festzustellen.

Die Untersuchung der Klongemische bestätigt die transkriptionsaktivierende Wirkung der S/MAR-Elemente E und W. In Abwesenheit des Enhancers konnte in CHO-K1-Zellen eine deutliche Erhöhung der Transkriptionsrate und erstmalig ein starker expressionsstabilisierender Effekt nachgewiesen werden. Es wäre interessant, die Eigenschaften der S/MAR-Elemente in diesem Kontext durch Expressionsstudien in Einzelkopieklonen und

Untersuchungen vor dem gleichen genomischen Hintergrund genauer zu analysieren. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Effekte der untersuchten S/MAR-Elemente und Insulatoren nicht in jedem Kontext gleich sind, sondern von der Anwesenheit weiterer cis-agierender Elemente wie Enhancer und auch von der Zelllinie abhängen. Diese Kriterien sollten bei der Untersuchung der Eigenschaften cis-agierender Elemente stets berücksichtigt werden.

3. Diskussion

Cis-agierende Elemente wie Enhancer, LCRs, Silencer und Insulatoren gewährleisten eine korrekte Regulation der Genaktivität in komplexen eukaryontischen Genomen. Sie beeinflussen die Transkription auf vielfältige Weise (Wilson et al., 1990) durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und DNA-modifizierenden Enzymen. Die Charakterisierung der Wirkungsweise dieser regulatorischen Elemente ist von Interesse, da Veränderungen ihrer Sequenz häufig zu Deregulationen führen und mit Krankheiten assoziiert sind. Ein Beispiel hierfür sind Deletionen im β -Globin-LCR, welche Thalassämien verursachen (Weatherall, 1994). Weiterhin werden cis-agierende Elemente in Expressionsvektoren für Biotechnologie und Gentherapie genutzt, um eine hohe und stabile Genexpression zu erzielen. Insbesondere retrovirale Vektoren ermöglichen einen effizienten Gentransfer in verschiedene Zelltypen einschließlich Zellen des hämatopoetischen Systems (Mulligan, 1993). Allerdings kann eine für Gentherapieansätze essentielle, stabile Langzeitexpression der transduzierten Gene mit diesen Vektoren häufig nicht erreicht werden. Zum einen unterliegen die therapeutischen Gene aufgrund der zufälligen Integration ins zelluläre Genom Positionseffekten der chromosomalen Umgebung, zum anderen führt *de novo* Methylierung des retroviralen LTRs oftmals zur Inaktivierung der Genexpression (Challita et al., 1994; Hoebe et al., 1991; Palmer et al., 1991). Daher ist es wünschenswert, mithilfe von cis-agierenden Elementen, die solchen Inaktivierungsmechanismen entgegenwirken, diese Limitationen zu überkommen.

Eine besondere Klasse cis-agierender Elemente sind 'scaffold/matrix attachment regions' (S/MARs), welche eine Rolle bei der strukturellen Organisation eukaryontischer Genome spielen. Ein cis-agierender Einfluss von S/MAR-Elementen wurde häufig beschrieben, jedoch ist ihre Funktionsweise bisher noch nicht vollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung ausgewählter S/MAR-Elemente auf die Transgenexpression in verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Neben der Analyse ihres Einflusses in zufälligen Integrationsorten sollte die S/MAR-Wirkung auch vor einem definierten genomischen Hintergrund analysiert werden, da dieser die Genexpression entscheidend beeinflusst. Dies ist möglich durch den Einsatz sequenzspezifischer Rekombinationssysteme, welche wichtige Werkzeuge zur Modifikation des Mammaliagenoms darstellen. Es wurden zwei unterschiedliche auf dem Flp/FRT-System beruhende Systeme verwendet. Das Exzisions-

konzept erlaubt das definierte Entfernen genomisch integrierter S/MAR-Elemente, während durch ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes RMCE (‘recombinase-mediated cassette exchange’)-Konzept die Integration von zu analysierenden Genkassetten im gleichen genomischen Ort ermöglicht werden sollte. Im folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkung der S/MAR-Elemente auf die Transgenexpression diskutiert und die verschiedenen verwendeten Systeme bewertet werden.

3.1 Die Untersuchung von S/MAR-Elementen im chromosomalen Kontext

Neben Enhancern und LCRs sind S/MAR-Elemente DNA-Sequenzen, welche mit Expressionsaktivierung assoziiert sind. Sie unterscheiden sich von Enhancern dadurch, dass ihre Wirkung auf den stabil ins Genom integrierten Zustand beschränkt ist. Die Bindung an die Kernmatrix ist ein wesentliches Kriterium zur Charakterisierung dieser Elemente und offensichtlich Voraussetzung für die Förderung der Genexpression. Die Mehrzahl der zur Untersuchung der S/MAR-Wirkung durchgeführten Studien beruhte bislang auf der Transfektion S/MAR-haltiger und S/MAR-loser Reporterkonstrukte und Vergleich der Expression der erhaltenen Klongemische. Dies bietet den Vorteil, dass bei einer großen Anzahl von Klonen im Gemisch die S/MAR-Effekte gleichzeitig in verschiedenen Loci gemessen werden und so statistisch gut abgesichert sind. So kann ohne großen Screeningaufwand ein Hinweis auf die Wirkung der untersuchten Elemente erhalten werden. Allerdings ist eine genaue Quantifizierung und ursächliche Zuordnung des Effekts nicht möglich, da in Klongemischen die Anzahl sowie die Anordnung der integrierten Kopien variiert. Daher sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben Klongemischen auch Einzelkopieklone untersucht worden. Da sich in unterschiedlichen Integrationsorten die Wirkung der S/MAR-Elemente auf die Genexpression aufgrund der Anwesenheit von cis-agierenden Elementen wie Enhancern und Silencern stark unterscheiden kann, empfiehlt sich die Expressionsanalyse vor dem gleichen genomischen Hintergrund. So beruhen Expressionsunterschiede allein auf der An- bzw. Abwesenheit der S/MAR-Elemente. Die Untersuchungen der S/MAR-Wirkung im gleichen Integrationsort sollten durch Verwendung zweier auf sequenzspezifischer Rekombination beruhender Konzepte durchgeführt werden.

Mit den verschiedenen beschriebenen Versuchsansätzen sollte der Effekt von S/MAR-Elementen sowohl auf die Höhe als auch auf die Langzeitstabilität der Expression analysiert werden. Die Analysen der S/MAR-Wirkung im gleichen Integrationsort sollten weiterhin zur Klärung des Wirkungsmechanismus von S/MARs dienen. Aufgrund unzureichender Versuchsansätze ist bislang unklar, ob S/MAR-Elemente durch einen cis-agierenden Effekt, d.h. eine direkte Aktivierung der Transkription, eine Abschirmung des Transgens vom umliegenden Chromatin oder über Lenkung der Transgenintegration in Chromatinbereiche mit transkriptionsaktivierenden Eigenschaften ('Targeting'-Effekt) wirken.

3.2 Die S/MAR-Elemente E und W steigern die Expression benachbarter Transgene in Klongemischen

In früheren Arbeiten konnte ein starker aktivierender Effekt der S/MAR-Elemente E und W bei Flankierung eines Luziferase-Reportergens beobachtet werden. Dies war sowohl in Klongemischen (Klehr, 1991) als auch in Einzelklonen (Bode et al., 1998) der Fall. Die verwendeten Konstrukte Lu, ELu und ELuW enthalten neben dem Luziferasegen ein Neomycinphosphotransferase-Gen als Selektionsmarker. Im Konstrukt ELuW, welches die höchste Luziferase-Expression erbrachte, trennt das S/MAR W diese Expressionseinheiten räumlich voneinander (Abb. 2.1), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass der erzielte Effekt auf eine Reduktion von Promotorinterferenzen zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Effekte der S/MAR-Elemente auf die Expression beider Gene nach unterschiedlicher Linearisierung gemessen. Die Linearisierung mit NruI, welche eine Vergrößerung des Abstands der Expressionseinheiten bewirkt, ist günstiger für die Expression beider Gene (Abb. 2.2). Offensichtlich werden so Interferenzen zwischen den Promotoren der zwei Expressionseinheiten verringert. Die S/MAR-Elemente haben einen aktivierenden Einfluss auf die Expression beider Gene. Das S/MAR E erhöht, unabhängig von der Linearisierung, in der Zelllinie CHO K1 die Klonzahl um das Vierfache. Die Anwesenheit beider S/MAR-Elemente bewirkt eine Steigerung der Klonzahl um den Faktor 7,2, allerdings beruht dieser Effekt möglicherweise auf einem Abstandseffekt des S/MAR W, da eine höhere Klonzahl mit dem Konstrukt ELu nach Linearisierung mit NruI erzielt wurde. Die stärksten transkriptionsaktivierenden Effekte der S/MAR-Elemente sind nach Linearisierung mit PvuI

auf die Expression des Luziferase-Reporters zu erkennen. In NIH-3T3-Zellen steigert das S/MAR E die Luziferase-Expression um den Faktor 15, die Flankierung mit beiden S/MAR-Elementen ergibt eine Erhöhung um das 46fache und in CHO-K1-Zellen um das 29fache. Die Wirkung der S/MAR-Elemente auf die Luziferase-Expression nach Linearisierung mit NruI ist deutlich geringer. Auch ist die Expression des Konstrukts ELu nach Linearisierung mit NruI niedriger als die des Konstrukts ELuW nach Linearisierung mit PvuI, was dafür spricht, dass die durch das S/MAR W erzielte Expressionserhöhung nicht allein auf einem größeren Abstand der beiden Expressionseinheiten beruht.

Diese Daten bestätigen den transkriptionsaktivierenden Einfluss der S/MAR-Elemente E und W im beschriebenen System. Die Expressionssteigerungen liegen in der gleichen Größenordnung, wie in vergleichbaren früheren Arbeiten beschrieben (Klehr, 1991; Klehr et al., 1991; Bode et al., 1998).

Welcher Mechanismus liegt dem beobachteten S/MAR-Effekt zugrunde? Nach Transfektion von S/MAR-haltigen und S/MAR-freien Konstrukten konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit des S/MAR E die Anzahl integrierter Kopien erhöht (Bode et al., 1996). Dies war jedoch nur bei Verwendung zirkulärer, nicht aber bei linearisierten Konstrukten der Fall (Bode et al., 1996). Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit die linearisierten Konstrukte per Elektroporation transferiert. Diese Methode erzielt bei Einsatz geringer DNA-Mengen eine bevorzugte Integration singulärer Kopien (Baer et al., 2000) und vermeidet auch sonst die Entstehung von 'tandem repeats', wie sie bei Calcium-Phosphat-Transfektion beschrieben wurden. Außerdem wurden ähnliche Expressionssteigerungen mit singulären Kopien der Konstrukte Lu, ELu und ELuW in CHO-Zellen erzielt (Bode et al., 1998), so dass ein Kopienzahleffekt unwahrscheinlich ist.

Ein direkter Effekt von S/MAR-Elementen auf die Transkriptionsinitiation wurde in einer früheren Arbeit nachgewiesen (Schübeler et al., 1996). Dies kann die beobachtete Erhöhung der Expression des Luziferase- und des Neomycinphosphotransferasegens erklären. Mögliche diesem Cis-Effekt zugrunde liegende Mechanismen sollen in Kap. 3.6 diskutiert werden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die S/MAR-Elemente Interferenzen zwischen den Promotoren beider Gene reduzieren. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insertion verschiedener S/MAR-Elemente zwischen zwei Expressionseinheiten der Suppression des 5'-Promotors durch den 3' gelegenen Promotor entgegenwirkt (Villemure et al., 2001). Dieser Effekt wurde durch Kontrollsequenzen nicht erzielt. In der

vorliegenden Arbeit wurden jedoch höhere Klonzahlen und Luziferase-Expressionen allein durch einen größeren Abstand beider Expressionseinheiten nach Linearisierung mit NruI erhalten (Abb. 2.2). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Wirkung der hier verwendeten S/MAR-Elemente nicht nur auf der Unterdrückung von Promotorinterferenzen beruht. Auch ein reiner Abstandseffekt kann ausgeschlossen werden, da die Luziferase-Expression der PvuI-linearisierten ELuW-Klongemische höher als die der NruI-linearisierten ELu-Gemische war, in welchen der Abstand zwischen den Expressionseinheiten größer ist (vgl. Abb. 2.2C und D). Die Expressionserhöhungen durch das S/MAR E, welches sich bei PvuI-Linearisierung 5' beider Gene befindet, sprechen sogar für einen direkten Effekt dieses Elements auf die Transkriptionsrate.

Alternativ könnten die S/MAR-Elemente durch ihre Fähigkeit zur Bindung an die Kernmatrix, an welcher Transkriptionsprozesse stattfinden (Berezney et al, 1995), die Integration der Transgene in transkriptionell aktive Bereiche fördern. Ob die beobachtete S/MAR-Wirkung auf einem solchen 'Targeting'-Effekt oder auf einem direkten Cis-Effekt beruht, kann mit dem beschriebenen System nicht unterschieden werden. Weiterhin wäre es günstig, die S/MAR-Wirkung in Einzelkopieklonen oder vor einem definierten genomischen Hintergrund zu betrachten, da in Klongemischen die Effekte in einer Vielzahl von Integrationsorten gemessen werden, welche einen nicht vorhersagbaren Einfluss auf die Expression haben, und die Kopienzahl und Integrationsform des Transgens unklar ist. Daher sollen im folgenden weiterführende Untersuchungen zur S/MAR-Wirkung vor dem gleichen genomischen Hintergrund und in Klonen mit singulärer Kopie eines Transgens diskutiert werden.

3.3 Die Untersuchung von S/MAR-Elementen vor dem gleichen genomischen Hintergrund mittels Exzision

Das in Abb. 2.3 dargestellte Exzisionssystem ermöglicht die Analyse von S/MAR-Elementen vor dem gleichen genomischen Hintergrund. Nach Integration des Vektors 8SVbg8 in singulärer Kopie können durch Einsatz der sequenzspezifischen Rekombinasen Cre und Flp selektiv das 5'-S/MAR-Element, das 3'-S/MAR-Element oder beide Elemente entfernt werden. Nach Transfektion eines Flp-exprimierenden Plasmids wird das von FRT-Sites

flankierte 5' gelegene S/MAR800 exziiert, die Cre-Rekombinase entfernt das von loxP-Sites flankierte 3'-S/MAR800. Der Vergleich der Expression vor und nach Entfernung der S/MAR-Elemente erlaubt Rückschlüsse auf deren Funktion. Die S/MAR-Elemente rahmen das Fusionsgen *β-geo* ein, welches aus dem Reportergen *β*-Galaktosidase und dem Resistenzmarker Neomycinphosphotransferase zusammengesetzt ist. Die Verwendung einer Fusion von Reporter- und Selektionsgen verhindert die unter 3.2 diskutierte Interferenz zweier Expressionskassetten. Die exprimierte *β*-Galaktosidase ermöglicht die sensitive Quantifizierung der Expressionshöhe nach Zellaufschluss und kann durch Anfärbung in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Dieser Einzelzellnachweis erlaubt die Untersuchung des Einflusses der S/MAR-Elemente auf die Langzeitstabilität der Expression.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der flankierenden S/MAR800-Elemente auf Höhe und Stabilität der *β*-Galaktosidase-Expression in den Zelllinien CHO K1 und NIH 3T3 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen im folgenden diskutiert werden.

3.3.1 Die Wirkung der Exzision der flankierenden S/MAR800-Elemente auf die Expressionshöhe hängt vom Integrationsort ab

In CHO-K1-Zellen konnte die Exzision eines oder beider S/MAR-Elemente in drei unterschiedlichen Integrationsorten, welche eine intakte singuläre Kopie des Vektors 8SVbg8 enthielten, effizient durchgeführt werden. Von den erhaltenen Exzisionsklonen wurden bis auf eine Ausnahme jeweils mindestens zwei genetisch identische Subklone untersucht. Bei Klon 40 wurden alle Exzisionen doppelt durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Expressionsdaten zu überprüfen. In NIH-3T3-Zellen konnte die Exzision beider S/MAR-Elemente nur in Klon 4 durchgeführt werden, hier wurden je drei identische Subklone mit 5'-, 3'- oder Doppellexzision untersucht. Bei Klon 15 konnte lediglich die Exzision des 5'-S/MAR-Elements durchgeführt werden. Abb. 3.1 zeigt zusammenfassend die Auswirkung der Exzision der S/MAR800-Elemente auf die Expressionshöhe. Die Expressionsdaten der genetisch identischen Subklone sind hier als Mittelwert angegeben. In beiden Zelllinien hat die Exzision der S/MAR-Elemente einen vom Integrationsort abhängigen aktivierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Genexpression. In drei Integrationsorten wird die Expression nach Exzision durchschnittlich erniedrigt (C37, C40 und N15), d.h. die S/MAR-Elemente

üben hier eine expressionsfördernde Funktion aus. In zwei Integrationsorten (C18 und N4) erhöht die Exzision die Expression, was auf eine reprimierende Wirkung der S/MAR-Elemente hindeutet. Diese Beobachtung ist unerwartet, da bisherige Literaturdaten ausschließlich auf aktivierende S/MAR-Einflüsse hindeuten. Allerdings sind frühere Untersuchungen meist durch Transfektionsexperimente in zufälligen Loci durchgeführt worden, so dass definierte Wirkungen vor dem gleichen genomischen Hintergrund nicht detektiert werden konnten. Denkbar ist, dass aktivierende S/MAR-Effekte auf der Abschirmung von einer zumeist negativ agierenden chromosomalen Umgebung beruhen. Festenstein et al. (1996) beobachteten in transgenen Mäusen eine frequente Integration von Transgenen in centromeres Heterochromatin, was mit Inaktivierung der Expression assoziiert war. Diese konnte durch Insertion einer LCR-Sequenz überkommen werden.

Die Exzision beider S/MAR-Elemente verstärkt in den meisten Integrationsorten den nach Exzision eines Elements beobachteten Effekt. Dies deutet auf eine additive Wirkung der S/MAR-Elemente hin. Offensichtlich ist die Position des S/MAR800-Elements nicht von grundlegender Bedeutung für die Expression, da in einigen Integrationsorten ein größerer Effekt nach Exzision des 5'-S/MARs beobachtet wurde, in anderen nach Exzision des 3'-

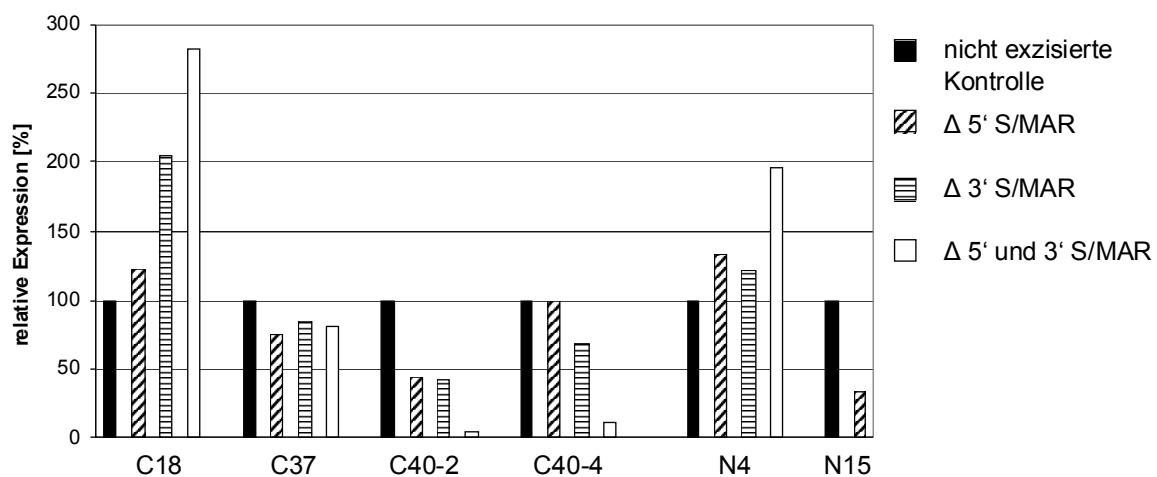


Abb. 3.1: Auswirkung der Exzision flankierender S/MAR-Elemente auf die Expressionshöhe.

Die relative β -Galaktosidase-Expression ist als Mittelwert der Expressionen der genetisch identischen Subklone aus den Abb. 2.7, 2.8 und 2.11 angegeben. Die Expression der nicht exzisierten Kontrollklone ist auf 100% gesetzt und als schwarze Balken dargestellt. Die diagonal gestreiften Balken symbolisieren die Expression der 5' exzisierten Klone, die quer gestreiften die der 3' exzisierten und die weißen die der doppelt exzisierten Klone. C = CHO K1, N = NIH 3T3. Von Klon C40 wurden die Exzisionen in zwei Parallelansätzen durchgeführt (C40-2 und C40-4).

S/MARs. Die von der genomischen Umgebung abhängige Wirkung der S/MAR-Elemente wurde schon in einer früheren Arbeit bei Anwendung des Exzisionskonzepts in CHO-K1-Zellen beobachtet (Seibler, 1999). Hier hatte die Exzision des 3'-S/MAR-Elements entweder einen reprimierenden oder keinen Effekt auf die Expressionshöhe.

Die mithilfe des Exzisionskonzepts gewonnenen Daten sprechen für eine die Expressionskassette abschirmende Wirkung der S/MAR800-Elemente. Die genomische Umgebung kann aktivierende Elemente wie LCRs und Enhancer oder reprimierende Elemente wie Silencer enthalten. Das Transgen flankierende S/MAR-Elemente können möglicherweise deren Einfluss auf die Expression des *β -geo*-Gens blockieren. So sollte nach der Exzision eines S/MAR-Elements das umliegende Chromatin stärkeren Einfluss auf die Transgenexpression nehmen können. Eine Verstärkung dieses Effekts nach Exzision des zweiten S/MAR-Elements ist denkbar und war in den meisten der untersuchten Integrationsorte der Fall.

Anhand der vorliegenden Daten kann nicht unterschieden werden, ob die S/MAR800-Elemente im vorliegenden System einen rein räumlichen Abstandseffekt ausüben oder ob sie über eine Insulator-ähnliche Wirkung Gene aktiv von Positionseffekten abschirmen (Bell et al., 2001; Gerasimova und Corces, 2001). Denkbar ist in diesem Zusammenhang, dass über Matrixbindung der flankierenden S/MAR-Elemente eine unabhängig von der Umgebung transkribierte Gendomäne aufgebaut wird (Mishra und Karch, 1999), welche nach Exzision der S/MAR-Elemente zerstört wird.

Diese Ergebnisse schließen einen in jedem Kontext transkriptionsaktivierenden Cis-Effekt von S/MAR-Elementen aus, da in diesem Fall eine Exzision der S/MAR-Elemente zu keiner Transkriptionserhöhung geführt hätte. Auch ein 'Targeting'-Effekt ist unwahrscheinlich, denn bei Lenkung der Integration in transkriptionell aktive Chromatinbereiche hätte die Exzision keine Auswirkung auf die Genexpression gehabt.

Ein auffälliges Ergebnis ist weiterhin die Variation der *β -geo*-Expressionshöhe einiger genetisch identischer Subklone nach Exzision, welche in beiden Zelllinien zu beobachten ist (Abb. 2.7, 2.8 und 2.11). Die Schwankung der Expressionshöhe ist nach Exzision beider S/MAR800-Elemente sogar noch größer als nach Exzision nur eines S/MAR-Elements. Eine ähnliche Variation der Expression einiger Subklone nach Exzision eines S/MAR800-Elements war auch in einer früheren Arbeit in CHO-K1-Zellen zu beobachten (Seibler, 1999). Jedoch konnte hier die Doppellexzision nur in einem Klon durchgeführt werden, welcher geringe Variation der Expressionshöhe der Subklone zeigte. Es ist allerdings beobachtet

worden, dass CHO-Zellen eine reproduzierbare Genexpression aufweisen (Fukushige und Sauer, 1992). Diese Eigenschaft ist eine wesentliche Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der mithilfe des Exzisionskonzepts gewonnenen Daten, da aufgrund der Aufwändigkeit des Systems die Analysen nicht in einer statistisch signifikanten Zahl von Integrationsorten durchgeführt werden können. Eine Erklärung für die Variation der Expression der Subklone könnte der abschirmende Charakter der S/MAR-Elemente sein. Nach Exzision eines und noch stärker nach Exzision beider S/MAR-Elemente ist das Transgen den Einflüssen der genomischen Umgebung ausgesetzt. Diese können reprimierend sein wie z.B. DNA-Methylierung oder aktivierend wie bestimmte Modifikationen der Histone (Kouzarides, 2002; Berger, 2002). Möglicherweise ist die Ausbreitung dieser epigenetischen Einflüsse zum Transgen hin kein dominanter, sondern ein stochastischer Prozess wie die unter 3.3.2 näher beschriebene ‘position effect variegation’. Dies würde die Variation der Expressionshöhe genetisch identischer Subklone erklären.

Für den Einfluss der Exzision eines S/MAR-Elements auf den Zustand des Chromatins am Integrationsort spricht die Beobachtung, dass in CHO-K1-Zellen die Effizienz der zweiten Exzision herabgesetzt war. Möglicherweise liegt dies an einer reduzierten Zugänglichkeit des Locus für die Rekombinase. Allerdings konnte diese Beobachtung auch in einem Integrationsort gemacht werden, dessen Expression durch die Exzision der S/MAR-Elemente aktiviert wurde. Jedoch sind die Mechanismen, welche die Chromatinstruktur beeinflussen, vielfältig (Berger, 2002; Simon und Tamkun, 2002) und es ist unklar, welchen Einfluss sie auf Rekombinationsereignisse haben.

3.3.2 Die S/MAR800-Elemente stabilisieren die Expression

Neben der Höhe wird auch die Langzeitstabilität der Expression eines Transgens von der genomischen Umgebung beeinflusst. Die Integration eines Transgens in die Nähe von Heterochromatin kann zum Verlust der Expression als Folge der Inaktivierung des Promotors (‘gene silencing’) führen. Dieses als ‘position effect variegation’ (PEV, ‘positionsabhängiges Muster’) bezeichnete Phänomen führt zur stochastischen Inaktivierung der Expression, d.h. ein Teil der Zellen exprimiert das Transgen, während der andere Teil keine Expression zeigt. Vom Integrationsort abhängiger Verlust der Genexpression wurde in der Fruchtfliege

Drosophila (Dernburg et al., 1996) sowie in transgenen Pflanzen (Day et al., 2000) und Mäusen (Martin und Whitelaw, 1996; Dobie et al., 1997) beschrieben. Auch in eukaryontischen Zelllinien wurden unterschiedliche Inaktivierungsraten in Abhängigkeit vom Integrationsort (Walters et al., 1996) und sogar im gleichen Integrationsort bei unterschiedlicher Orientierung des Transgens (Feng et al., 2001) beobachtet. Mit der Inaktivierung assoziierte Prozesse sind die Methylierung regulatorischer Sequenzen (Feng et al., 2001) sowie ein Verlust DNase I hypersensitiver Sites, reduzierte Zugänglichkeit des Chromatins und Lokalisierung des Transgens im Interphasekern in die Nähe von centromerem Heterochromatin (Francastel et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass cis-regulatorische Sequenzen wie Enhancer (Walters et al., 1996; Francastel et al., 1999), LCRs (Festenstein et al., 1996) und Insulatoren (Pikaart et al., 1998; Potts et al., 2000) PEV verhindern können. Auch gibt es Hinweise darauf, dass S/MAR-Elemente der Expressionsinaktivierung entgegenwirken können. Dies wurde in Pflanzen beobachtet (Übersicht in Allen et al., 2000) und in *Drosophila* verhindert ein synthetisches Protein, welches S/MAR-DNA mit hoher Affinität bindet, 'position effect variegation' (Girard et al., 1998). Daher sollte überprüft werden, ob die Exzision der S/MAR800-Elemente einen Einfluss auf die Stabilität der β -Galaktosidase-Expression hat. Hierfür wurden die exziierten und die Kontrollklone über mehrere Wochen in An- und Abwesenheit von Selektionsdruck kultiviert und die β -Galaktosidaseexpression auf Einzelzellbasis durch Anfärbung untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass die Inaktivierung der Expression vom Integrationsort abhängt. In CHO-K1-Zellen zeigte sich ein starker Expressionsverlust in einem der 3' exziierten Subklone von Klon 40 (Abb. 2.9), in NIH-3T3-Zellen war die Inaktivierung der Expression in 5', 3' und doppelt exziierten Subklonen von Klon 4 zu beobachten (Abb. 2.12). Die Inaktivierung ist also ein stochastischer Vorgang, da sie nicht in allen genetisch identischen Subklonen gleichermaßen auftritt. Die Anwesenheit beider S/MAR800-Elemente verhindert den Inaktivierungsprozess, da in den Kontrollklonen kein Expressionsverlust erfolgt. Offensichtlich ist die Wahrscheinlichkeit, dass Expressionsverlust auftritt, in den genannten Integrationsorten nach Exzision eines S/MAR-Elements erhöht. Ob die Exzision beider S/MAR800-Elemente die Inaktivierungswahrscheinlichkeit noch weiter heraufsetzt, ist nicht klar. Zwar zeigen in NIH-3T3-Zellen zwei von drei der doppelt exziierten Subklone von Klon 4 Inaktivierung, doch ist der Anteil nicht exprimierender

Zellen bei dem Klon E4E-3 (Abb. 2.12) sehr gering. Da hier nur Daten von einem Integrationsort zur Verfügung stehen, kann diese Frage nicht eindeutig geklärt werden.

Die expressionsstabilisierende Wirkung der S/MAR800-Elemente korreliert offenbar nicht mit der die Transkriptionsrate aktivierenden, da im NIH-3T3-Klon 4 die Exzision der S/MAR-Elemente einen im Durchschnitt positiven Einfluss auf die Expressionshöhe hat (Abb. 3.1), aber die Stabilität der Expression herabsetzt (Abb. 2.12).

Welche Mechanismen liegen der Verringerung der Inaktivierungswahrscheinlichkeit durch die S/MAR-Elemente zugrunde? In zwei früheren Arbeiten reduzierte eine Kopie des S/MAR800 Expressionsverlust in retroviral transduzierten T-Zellen (Agarwal et al., 1998; Auten et al., 1999). In einer nachfolgenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das S/MAR Methylierung des retroviralen 5'LTRs verhindert und auch die reprimierenden Effekte *in vitro* methylierter Konstrukte zumindest teilweise aufhebt (Dang et al., 2000). Da die Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Histondeacetylierung bestätigt wurde (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998), liegt die Vermutung nahe, dass S/MAR-Elemente die Ausbildung reprimierender Chromatinstrukturen verhindern. Eine Bestätigung hierfür liefert die Beobachtung, dass die S/MAR-Elemente aus dem Immunglobulin μ 'heavy chain' Locus der Methylierungs-abhängigen Repression des Ig μ Enhancers durch Histonacetylierung und damit „Öffnung“ des Chromatins entgegenwirken (Forrester et al., 1999). Ein direkter Beweis der Verbindung zwischen S/MAR-Elementen und Histonacetylierung wurde kürzlich durch Nachweis der Interaktion zwischen dem S/MAR-bindenden Protein SAF-A und dem Coaktivator p300 erbracht, welcher Acetyltransferase-Aktivität besitzt (Martens et al., 2002). Daher ist es wahrscheinlich, dass S/MAR-Elemente positionsabhängige Inaktivierung der Transgenexpression durch Beteiligung an der Ausbildung einer offenen Chromatinstruktur verhindern.

3.4 Die Analyse cis-agierender Elemente mittels RMCE

Die Expressionsanalysen nach Exzision eines Reporter flankierender S/MAR-Elemente zeigten einen vom Integrationsort abhängigen aktivierenden oder reprimierenden Mechanismus dieser Elemente (Kap. 3.3.1). Da dies auf eine vom umliegenden Chromatin abschirmende Wirkung dieser Elemente hindeutet, sollte im Rahmen dieser Arbeit die

S/MAR-Wirkung direkt mit der eines bekannten Chromatin-Insulators verglichen werden. Die 5' hypersensitive Site 4 aus dem β -Globin-Gencluster des Huhns (cHS4) ist die am besten charakterisierte Insulator-Sequenz bei Vertebraten (Chung et al., 1993 und 1997) und besitzt die Fähigkeit, ein Reportergen in Zelllinien von Positionseffekten abzuschirmen (Pikaart et al., 1998). Die Wirkungen der S/MAR-Elemente E und W bezüglich Höhe, Stabilität und Variation der Expression eines flankierten GTN-Fusionsgens sollten mit der von Insulator-Dimeren in Einzelkopieklonen in zufälligen Integrationsorten sowie vor dem gleichen genomischen Hintergrund verglichen werden. Für die Analyse der Elemente im gleichen Integrationsort sollte das in Abb. 2.13 schematisch dargestellte, auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem FIp/FRT beruhende RMCE-Konzept ('recombinase-mediated cassette exchange'; Seibler und Bode, 1997; Übersicht in Baer und Bode, 2001), Verwendung finden. Um einen räumlichen Abstandseffekt der zu untersuchenden Elemente auszuschließen, wurde als Kontrolle ein mit Sequenzen aus dem Bakteriophagen Lambda flankiertes Konstrukt verwendet. Diese sind den S/MAR-Elementen in der Länge äquivalent und besitzen keine Matrix-Bindung (Abb. 2.15). Mithilfe des vorgestellten Systems sollte weiterhin durch den in Abb. 2.16 dargestellten Austausch von S/MAR- gegen Kontrollsequenzen und umgekehrt ein möglicher 'Targeting'-Effekt der S/MAR-Sequenzen analysiert werden, welcher durch das Exzisionskonzept nicht untersucht werden konnte.

3.4.1 Die S/MAR-Elemente und Insulatoren haben keinen Einfluss auf die transiente Expression

Nach Transfektion der mit den zu untersuchenden Sequenzen flankierten Konstrukte in CHO-K1-Zellen konnte durch Messung der transienten eGFP-Expression kein Einfluss der S/MAR-Elemente und Insulatoren festgestellt werden (Abb. 2.17). Dieses war erwartet worden, da S/MARs nur im ins Chromatin integrierten Zustand wirken – ein Kriterium, das zu ihrer Unterscheidung von klassischen Enhancern dient. So konnten frühere Beobachtungen (Klehr et al., 1991) bei S/MAR-Elementen und S/MAR-Elementen mit Insulator-Charakter (Kalos und Fournier, 1995) bestätigt werden, welche keine oder eine reprimierende Wirkung auf die transiente Expression zeigten. Die Lambda-Sequenzen haben ebenfalls keine unmittelbaren

positiven oder negativen Auswirkungen auf die Transkriptionsrate und sollten daher als Kontrollsequenzen geeignet sein.

3.4.2 Die S/MAR-Elemente E und W sowie der cHS4-Insulator erhöhen die Expression von Einzelkopieklonen

Zunächst wurde überprüft, ob die das Fusionsgen GTN flankierenden S/MAR- und Insulator-Sequenzen im ins Genom integrierten Zustand einen Einfluss auf die Höhe der Expression ausüben. Die Messung der eGFP-Expression einer statistisch signifikanten Anzahl von CHO-K1-Einzelkopieklonen ergab, dass die S/MAR-Klone durchschnittlich eine 1,5 mal höhere Expression als die Kontrollklone haben und die Insulator-Klone eine 2,1 mal höhere (Abb. 2.20 und Tabelle 2.8). Ein leicht reprimierender Effekt der Lambda-Kontrollsequenzen, wie in Klongemischen beobachtet (Abb. 2.26B), kann auch bei den Einzelkopieklonen nicht ausgeschlossen werden. Da alle untersuchten Klone eine intakte singuläre Kopie des Transgens tragen, können die Expressionsunterschiede direkt auf den Einfluss der unterschiedlichen flankierenden Sequenzen und deren Wechselwirkung mit dem umliegenden Chromatin am Integrationsort zurückgeführt werden. Die S/MAR- und Insulator-Sequenzen üben also einen aktivierenden Einfluss auf die Transkriptionsinitiation aus (siehe auch Schübeler et al., 1996). In früheren Arbeiten (Klehr et al., 1991; Poljak et al., 1994; Stünkel et al., 2000) und in Kap. 2.1 dieser Arbeit wurde eine deutlichere Transkriptionsaktivierung durch S/MAR-Elemente bei Flankierung eines Reportergens beobachtet. Zumeist wurden die Effekte der S/MAR-Elemente in diesen Untersuchungen in Klongemischen und Einzelklonen mit mehreren integrierten Kopien gemessen, so dass diese Ergebnisse nicht direkt mit den vorliegenden verglichen werden können. Allerdings konnten auch bei Untersuchung von Einzelkopieklonen stärkere S/MAR-Effekte mit einer Expressionsverstärkung um den Faktor 200 (Kalos und Fournier, 1995) bzw. 26 (Bode et al., 1998) beobachtet werden. Jedoch wurde in keiner dieser Arbeiten der Effekt von S/MAR-Elementen auf die Expression eines Fusionsgens untersucht, bei welchem Reporter- und Selektionsfunktion in gleichem Maße vorliegen. In den meisten Fällen wurden Klone über Cotransfektion eines Selektionsmarkers generiert oder Reporter- und Resistenzgen lagen wie in den in Kap. 2.1 untersuchten Plasmiden in separaten Expressionseinheiten vor. Da bei Cotransfektion Reporter- und

Selektionsmarker zwar meist, aber nicht zwangsläufig in einen genomischen Ort integrieren können, findet häufig nur eine Vorselektion auf die Expression des Resistenzgens statt. Bei einem Fusionsgen hingegen befindet sich durch die Kopplung der Funktionen der Reporter in einem Integrationsort, der eine Mindestexpression gewährleistet. Untersuchungen der S/MAR-Wirkung in Pflanzen bestätigen die Annahme, dass bei Kopplung von Selektions- und Reportergen der S/MAR-Effekt verringert wird (Allen et al., 2000). Bei Verwendung zweier Expressionseinheiten auf einem Plasmid kann es hingegen zu einer vom Integrationsort abhängigen nicht vorhersagbaren Interferenz der Promotoren kommen (Eszterhas et al., 2002) und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die S/MAR-Wirkung durch diese Interferenz beeinflusst wird (Kap. 3.2).

Weiterhin ist es möglich, dass die Wahl des Reportergens die Höhe des messbaren Effekts beeinflusst. Bislang ist zur Messung von S/MAR-Effekten noch nie eGFP als Reporter verwendet worden. Eine Beschränkung der Expressionshöhe aufgrund einer Cytotoxizität von eGFP (Felts et al., *Stratagene Strategies*) ist unwahrscheinlich, da Klone mit mehreren integrierten Kopien des Transgens eine noch höhere eGFP-Expression als der am höchsten exprimierende Einzelkopie-Klon H2.113 hatten (Daten nicht gezeigt). Die eGFP-Expression des Fusionsgens ist nur um den Faktor 2 geringer als die Expression von nicht fusioniertem eGFP (Unsinger, 2001), daher sollte die Verwendung von GTN die zu messende Expression nicht wesentlich verringern. Hingegen ist es wahrscheinlich, dass die GFP-Messung im FACS-Gerät wenig sensitiv ist. Bei hohen GFP-Konzentrationen steigt die Fluoreszenz nicht mehr linear zur Molekülzahl an (Scholz et al., 2000), so dass hochexprimierende Zellen in der FACS-Analyse weniger genau aufgelöst werden. Möglicherweise hätten durch Verwendung eines anderen Reporters, wie z.B. Luziferase, größere Expressionsunterschiede festgestellt werden können. Dieser ermöglicht jedoch keine Expressionsanalyse auf Einzelzellbasis und ist daher für die Untersuchung der Stabilität der Expression ungeeignet. Weiterhin ist es denkbar, dass der starke SV40-Enhancer die Expression so stark aktiviert, dass keine deutlicheren Unterschiede gemessen werden können. Daher wurden in Kap. 2.3.6 die Einflüsse der unterschiedlichen flankierenden Sequenzen in Abwesenheit des Enhancers untersucht.

Der stärkere transkriptionsaktivierende Effekt der cHS4-Dimere verglichen mit den S/MARs ist zunächst unerwartet, da der cHS4-Insulator sich transkriptionell neutral verhalten sollte (Bell und Felsenfeld, 1999). Allerdings ist er charakterisiert worden aufgrund seiner

Fähigkeit, Enhancer-Wirkung zu blockieren und Transgene von Positionseffekten abzuschirmen (Chung et al., 1993), und seine Auswirkung auf die Höhe der Transgenexpression ist nie systematisch untersucht worden. In letzter Zeit wurde jedoch deutlich, dass die Insertion von cHS4-Elementen in Expressionsvektoren zur Erhöhung der Expression von Transgenen führt. Dieser Effekt konnte in transgenen Kaninchen (Taboit-Dameron et al., 1999), Zelllinien und transgenen Mäusen (Pantano et al., 2002) sowie in retroviral infizierten NIH-3T3-Zellen (Emery et al., 2000) beobachtet werden.

Die Expressionserhöhung durch die cHS4-Dimere kann durch die Fähigkeit des Insulators, Histonhyperacetylierung von Transgenen zu fördern (Pikaart et al., 1998), erklärt werden. Auch im endogenen Kontext der β -Globin-Domäne des Huhns ist an der 5' hypersensitiven Site 4 Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 detektiert worden (Litt et al., 2001). Histonacetylierung ist assoziiert mit der Aktivierung vieler Promotoren (Übersicht in Struhl, 1998). Unklar ist jedoch, ob der Insulator die Rekrutierung von Histondeacetylaseaktivität inhibiert oder aktiv Histonacetyltransferasen zu der transkribierten Domäne lenkt.

Auch der Einfluss von S/MAR-Elementen auf Acetylierungsprozesse wurde kürzlich deutlich (Martens et al., 2002; Fernández et al., 2001). Dies soll in Kap. 3.6 eingehender diskutiert werden.

3.4.3 Sind S/MARs Insulatoren?

Kriterien von Insulatoren sind zum einen die Fähigkeit, bei Lokalisierung zwischen einem Promotor und einem Enhancer, die Wirkung des Enhancers auf den Promotor zu blockieren ('Enhancer blocking'), und zum anderen die Verleihung positionsunabhängiger Expression bei Flankierung von Transgenen (Bell und Felsenfeld, 1999). Einige Insulatoren, wie der in dieser Arbeit verwendete cHS4-Insulator besitzen beide Fähigkeiten. Um zu untersuchen, ob die S/MAR-Elemente E und W Insulator-Aktivität besitzen, wurde überprüft, ob sie eine positionsunabhängige Expression des Transgens ermöglichen. Hierzu wurde die Variation der Expressionshöhe der drei Einzelklonserien ermittelt. Die Expressionshöhe der mit den S/MAR- und Insulator-Sequenzen flankierten Transgene variiert jeweils um den Faktor 3,9 und ist somit geringer als die Variation der Kontrollklone, welche eine Variation der Expressionshöhe von 5,9 besitzen (Tab. 2.8). Der beobachtete Effekt ist nicht so ausgeprägt

wie in früheren Untersuchungen mit flankierenden S/MARs (Kalos und Fournier, 1995; Bode et al., 1998) und Insulatoren (Pikaart et al., 1998). Jedoch wurden in diesen Arbeiten auch keine Kontrollen mit „neutralen“ Sequenzen wie den hier verwendeten Lambda-Sequenzen durchgeführt, so dass die dort gemessenen Effekte zumindest zum Teil auf den größeren Abstand des Transgens zum umliegenden Chromatin zurückgeführt werden können.

Weiterhin ist es möglich, dass der cHS4-Insulator in CHO-Zellen nur geringe Abschirmungsfunktion besitzt. Das Protein CTCF, welches an viele Insulatoren und auch an cHS4 bindet, wird zwar ubiquitär exprimiert, ist aber nur für die ‘Enhancer Blocking’ Aktivität von cHS4 erforderlich. Die Fähigkeit zur Abschirmung von Positionseffekten ist in einem anderen Teil der Sequenz lokalisiert (Bell et al., 1999). So ist es denkbar, dass für diese Funktion weitere Proteinfaktoren benötigt werden, welche in CHO-Zellen nicht exprimiert werden. Allerdings schirmt der cHS4-Insulator in vielen unterschiedlichen Organismen und Zelltypen von Positionseffekten ab (Chung et al., 1993; Pikaart et al., 1998; Rivella et al., 2000; Emery et al., 2000, Potts et al., 2000). Daher ist es wahrscheinlich, dass die geringe Reduktion der Variabilität der Expressionshöhe auf Eigenschaften der verwendeten Expressionskassette zurückzuführen ist. So ist es möglich, dass die Anwesenheit des starken SV40-Enhancers die Expression auf ein Mindestniveau anhebt und so grundsätzlich die Variabilität verringert. Pikaart et al. (1998) beobachteten die stärksten Abschirmungseffekte des cHS4-Insulators mit Konstrukten, in welchen der Enhancer mutiert war.

Dass die S/MAR-Elemente im beschriebenen System das Transgen im gleichen Maß abschirmen wie der cHS4-Insulator, spricht für eine Insulator-Funktion. Die mit dem Exzisionssystem erzielten Ergebnisse stützen diese Hypothese, da die S/MAR800-Elemente, welche Subfragmente des S/MAR E sind, ein Transgen sowohl von reprimierenden als auch von aktivierenden Einflüssen des umliegenden Chromatins abschirmen (Kap. 2.2).

Allerdings ist die Insulator-Funktion von S/MAR-Elementen umstritten. Während das 3'-S/MAR-Element der humanen Apolipoprotein B Domäne Positionsunabhängigkeit der Expression in Mammaliazellen (Kalos und Fournier, 1995) und in *Drosophila* (Namciu et al., 1998) gewährleistet, gilt dies nicht für das *hsp70*- und das Histon-S/MAR aus *Drosophila* (Poljak et al., 1994). Das 5' A-Element aus der Lysozym-Gendomäne des Huhns wiederum verleiht flankierten Transgenen Positionsunabhängigkeit und besitzt außerdem die Fähigkeit, bei Positionierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor, die Aktivität des Enhancers zu blockieren. Weiterhin besitzt der gut charakterisierte *gypsy*-Insulator aus

Drosophila Matrixbindungseigenschaften (Nabirochkin et al., 1998), jedoch ist seine 'Enhancer Blocking' Aktivität unabhängig von der Fähigkeit, an die Matrix zu binden (Scott et al., 1999). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass einige S/MAR-Elemente Insulator-Eigenschaften besitzen, während andere weder in der Lage sind, von Positionseffekten abzuschirmen, noch einen Enhancer zu blockieren. Ob die untersuchten S/MAR-Elemente E und W auch 'Enhancer blocking' Aktivität besitzen, ist bislang noch nicht systematisch untersucht worden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass das S/MAR E die aktivierende Wirkung des CMV-Enhancers im stabil integrierten Zustand blockieren kann (Bode et al., 1995).

Welche Mechanismen liegen der Abschirmung von Positionseffekten durch S/MAR-Elemente und Insulatoren zugrunde? S/MAR-Elemente und Insulatoren sind an den Grenzen von Gendomänen lokalisiert. Man nimmt an, dass sie die korrekte Expression der Gene innerhalb einer Domäne über deren Abschirmung vom umliegenden Chromatin gewährleisten, so dass nur innerhalb der Domäne gelegene cis-regulatorische Elemente wirken können. Im Falle von S/MARs geht man davon aus, dass sie über Verankerung an die Kernmatrix eine Chromatinschleife ausbilden, welche unabhängig exprimiert wird (Mishra und Karch, 1999). Die Funktionsweise der verschiedenen charakterisierten Insulatoren ist noch nicht komplett verstanden und lässt sich nicht in einem einzigen Modell zusammenfassen (Bell et al., 2001). Einige Insulatoren üben ihre Effekte auf die Transkription offensichtlich über eine Beeinflussung der Chromatinstruktur aus. Der cHS4-Insulator z.B. zeigt starke DNaseI Hypersensitivität und trennt in Erythrozyten den β -Globin-Genlocus, der in diesen Zellen transkriptionell aktiv ist, von einer Region stark kondensierten Chromatins (Prioleau et al., 1999). Es wird vermutet, dass er die Ausbreitung dieser repressiven Chromatinstruktur über Histonacetylierung verhindert, da er mit Histonacetyltransferaseaktivität assoziiert zu sein scheint (Litt et al., 2001). Andere Insulatoren sind ähnlich wie S/MAR-Elemente an der Organisation einer Schlaufenstruktur des Chromatins beteiligt. Der *gypsy*-Insulator, welcher auch Matrixbindung zeigt, beeinflusst die subnukleäre Organisation von DNA. Die an den Insulator bindenden Su(Hw) und Mod(mdg4) Proteine lagern sich im Interphasekern an der Kernlamina zu ca. 20-25 Clustern zusammen und organisieren so die zwischen ihnen liegende DNA-Sequenz in Schlaufen (Gerasimova et al., 2000). Es ist denkbar, dass die DNA im Interphasekern durch Interaktion von DNA-bindenden Proteinen untereinander und mit strukturellen Komponenten wie der Kernmatrix in Schlaufen mit unabhängiger Genregulation

organisiert ist (Bell et al., 2001) Wahrscheinlich ist diese Organisation Voraussetzung für die korrekte Expression von Genen. Kürzlich konnte am Beispiel des humanen Apolipoprotein B Gens gezeigt werden, dass Insulatoren im Zusammenspiel mit nahe gelegenen S/MAR-Elementen durch unterschiedliche Schlaufenbildung in Leber und Dünndarm eine gewebespezifische Genexpression gewährleisten (Antes et al., 2001). Andere Insulatoren, welche über ihre ‘Enhancer Blocking’ Aktivität charakterisiert worden sind, verhindern möglicherweise über direktere Mechanismen die Interaktion von Enhancer und Promotor (Udvardy et al., 1999). Ein Hinweis auf die vielfältige Wirkungsweise verschiedener Insulatoren konnte durch die Beobachtung erbracht werden, dass diese selektiv und in unterschiedlichem Ausmaß die Wirkung von Chromatin-assoziierten Repressoren blockieren können (van der Vlag et al., 2000).

3.4.4 Die S/MAR-Elemente E und W sowie der cHS4-Insulator verringern das Ausmaß von Inaktivierungsprozessen

Die Fähigkeit der S/MAR-Elemente sowie des Insulators von Positionseffekten abzuschirmen, wirft die Frage auf, ob diese Elemente auch in der Lage sind, das Transgen vor positionsabhängiger Inaktivierung der Expression bei Langzeitkultivierung zu schützen. Dieses sog. ‘gene silencing’ wurde unter 3.3.2 näher beschrieben. Bei Kultivierung der Einzelkopieklone mit S/MAR-, Insulator-, und Kontrollflankierung in An- und Abwesenheit von Selektionsdruck über 31 Passagen wurden sowohl der Anteil exprimierender Zellen als auch Änderungen der Expressionshöhe bestimmt. Beide Phänomene wurden nachgewiesen (Abb. 2.22).

Ein Expressionsverlust einzelner Zellen trat bei sieben Prozent der Kontrollklone und bei etwa einem Viertel der S/MAR- und Insulator-flankierten Klone auf (Tab. 2.9). Jedoch war das Ausmaß der Inaktivierung, d.h. der Anteil inaktivierter Zellen, bei dem Kontrollklon L4 mit weniger als 50% nicht exprimierenden Zellen bei Passage 31 am höchsten (Abb. 2.21 und 2.22). Bei allen cHS4- und den meisten S/MAR-Klonen hatten zu diesem Zeitpunkt nur ca. 10% bis 20% der Zellen die Expression verloren. Für den am stärksten inaktivierten S/MAR-Klon S68 (Abb. 2.21 und 2.22) wurde gezeigt, dass der Expressionsverlust nicht durch epigenetische Prozesse aufgrund von Positionseffekten, sondern durch Verlust des Konstrukts

auf genetischer Ebene bei Kultivierung in Abwesenheit von Selektionsdruck zurückzuführen war. Hingegen handelte es sich bei dem Expressionsverlust des Kontrollklons L4 um klassisches ‘gene silencing’, da auch in inaktivierten Zellen keine Deletion des Konstrukts nachgewiesen wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass auch bei weiteren S/MAR-Klonen die Inaktivierung durch unspezifische Deletionen des Konstrukts verursacht wurde. Die Zelllinie CHO K1 scheint illegitime Rekombinationsprozesse zu fördern (siehe Kap. 3.3.5). Auch für S/MAR-Elemente wurde *in vivo* Rekombinogenität gezeigt (Bode et al., 2000b). Dies kann auf ihre erhöhte Neigung zur Einzelstrangbildung zurückzuführen sein. Ein Expressionsverlust von S/MAR-Konstrukten scheint auf die Kombination von in der Expressionskassette anwesenden Enhancer-Elementen, S/MARs und verwendeter Zelllinie zurückzuführen sein, da er in Abwesenheit des Enhancers verringert war und in NIH-3T3-Zellen nicht auftrat (Abb. 2.28 und Kap. 3.5).

Das geringe Ausmaß der Inaktivierung bei den restlichen Insulator- und S/MAR-Klonen spricht für eine reprimierenden Einflüssen des Chromatins entgegenwirkende Funktion dieser Elemente. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass auch der Anteil der Klone, welche eine Reduktion der Expressionshöhe zeigten, durch S/MAR-Elemente verringert wurde und bei Flankierung mit dem Insulator-Dimer dieses Phänomen nicht auftrat (Tab. 2.9). Ob die Absenkung der Expressionshöhe allerdings auf den gleichen molekularen Mechanismen wie die Inaktivierung beruht, ist nicht klar.

In einer früheren Arbeit konnten für den cHS4-Insulator dominante expressionsstabilisierende Einflüsse, welche mit Hyperacetylierung des Transgens assoziiert waren, beobachtet werden (Pikaart et al., 1998). Des weiteren wurden mit diesem Element eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Expression retroviraler Konstrukte, welche mit Reduktion der *de novo* Methylierung im LTR einherging (Rivella et al., 2000) sowie eine Langzeitstabilisierung der Transgenexpression in transplantiertem Knochenmark von Mäusen erzielt (Emery et al., 2000). Auch für S/MAR-Elemente konnten in dieser Arbeit mit dem Exzisionskonzept (Kap. 2.2) und in früheren Arbeiten mit verschiedenen Systemen expressionsstabilisierende Einflüsse gezeigt werden (siehe Kap. 3.3.2), deren mögliche Mechanismen unter 3.6 diskutiert werden.

3.4.5 Der Kassettenaustausch durch Anreicherung mit Negativselektion ist in der Zelllinie CHO K1 ohne Selektion auf Flp-Expression nicht durchführbar

Um die Effekte der S/MARs und Insulatoren miteinander und mit den Kontrollelementen vor dem gleichen genomischen Hintergrund vergleichen zu können, sollten in einigen der charakterisierten Einzelklone die integrierten Konstrukte gegen Austauschkonstrukte mit anderen flankierenden Sequenzen ausgetauscht werden. So sollte ebenfalls ein möglicher 'Targeting'-Effekt von S/MAR-Konstrukten überprüft werden (Abb. 2.16). Das Austauschereignis sollte über Negativselektion mit Ganciclovir auf den Verlust der Thymidinkinase hin angereichert werden. Die Austauschkonstrukte sind von den gleichen heterospezifischen FRT-Sites flankiert wie die Parentalkonstrukte und enthalten als Reporter ein Luziferase-eGFP Fusionsgen und keinen Selektionsmarker. Nach Transfektion der Austauschkonstrukte und des Flpe-Rekombinase exprimierenden Plasmids Flpe in unterschiedlichen Verhältnissen konnten nach Negativselektion keine Klone mit dem Austauschereignis generiert werden. Die Ganciclovir-resistenten Klone waren entweder durch positionsabhängige Inaktivierung des GTN-Gens spontanresistent, d.h. sie enthielten noch das Parentalkonstrukt, oder sie hatten das Konstrukt verloren. Die hohe Wahrscheinlichkeit, nach Negativselektion Klone mit inaktivierter Thymidinkinase-Expression zu erhalten, war nicht auf eine hohe Stabilität des GTN-Fusionsproteins zurückzuführen, da dieses zehnmal instabiler als eGFP ist. Bei Beginn der Negativselektion fünf Tage nach der Transfektion hätte es somit in Zellen mit dem Austauschereignis keine Sensitivität gegenüber Ganciclovir mehr vermitteln können. Die Verringerung der Austauschfrequenz bei Anreicherung über Negativselektion wurde schon in einer früheren Arbeit in embryonalen Stammzellen beobachtet, jedoch war diese nicht so ausgeprägt und es konnten in Loci mit geringer Spontanresistenz spezifische Austauschereignisse erzielt werden (Seibler et al., 1998). Die Austauschraten betrugen zwischen 21% und 38%. Mit Cre-vermitteltem RMCE, bei welchem aufgrund der Kreuzrekombination heterospezifischer loxP-Sites invertierte identische Rekombinase-erkennungsstellen verwendet werden, konnten durch Negativselektion Austauschraten von nahezu 100% in einer murinen Leukämiezelllinie und zwischen 10% und 50% in ES-Zellen erreicht werden (Feng et al., 1999). Wahrscheinlich ist die hohe Spontanresistenz von CHO-K1-Zellen ein Merkmal dieser Zelllinie.

In permanenten Zelllinien stellt auch die geringe Transfektionsrate eine Limitation dar. In NIH-3T3-Zellen konnte diese über Transfektion eines die Rekombinase und GFP exprimierenden Plasmids und anschließende FACS-Sortierung von Zellen, welche dieses Plasmid erhalten hatten, überkommen werden (Seibler, 1999). Da die Transfektion von CHO-K1-Zellen durch Verwendung des ‘Gene Porter 2’-Transfektionsprotokolls auf eine Transfektionseffizienz von bis zu 30% optimiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde zunächst erwartet, dass Austauschereignisse ohne Selektion auf Rekombinaseexpression durch Negativselektion angereichert werden könnten. Zudem zeigte eine frühere Arbeit, dass die Austauschreaktion in Hamster-Zellen, in diesem Fall der Zelllinie BHK21, effizienter abläuft als in NIH-3T3-Zellen (Seibler und Bode, 1997).

Es ist unwahrscheinlich, dass die häufig beobachtete Deletion der integrierten Parentalkonstrukte auf sequenzspezifische Exzision durch Kreuzrekombination der F3- mit der Wildtyp-FRT-Site zurückzuführen ist, da die Wildtyp-FRT-Site mit Mutanten, welche wie die F3-Site vier Mutationen in ihrer Spacer-Sequenz besitzen, nur sehr ineffizient rekombiniert (Schlake und Bode, 1994; Seibler und Bode, 1997). Zudem ergab sich eine ähnliche Anzahl spontanresistenter Klone nach Negativselektion in An- und Abwesenheit der Flpe-Rekombinase (Daten nicht gezeigt), so dass die Deletionen der Parentalkonstrukte nicht auf Rekombinaseaktivität zurückzuführen sind. Neben Deletionen waren auch viele unspezifische Rearrangements zu erkennen, was dafür spricht, dass in der Zelllinie CHO K1 illegitime Rekombinationsereignisse häufig auftreten. Dies mag mit der Tatsache in Zusammenhang stehen, dass CHO-K1-Zellen auf ihre Fähigkeit zu Methotrexat-assoziiertter Amplifikation von Transgenen hin selektioniert wurden. Tatsächlich weisen Zellen des Chinesischen Hamsters oft Veränderungen im Karyotyp auf (Deaven und Petersen, 1973). Diese sind wahrscheinlich durch das Vorkommen ausgedehnter TTAGGG ‘Repeats’ verursacht, welche mit Chromosomen-Brüchen und –Austausch in Nagerzellen assoziiert sind (Bouffler et al., 1996).

Da in NIH-3T3-Zellen der Austausch über Negativselektion und GFP-FACS-Sortierung nach Transfektion eines die Rekombinase und GFP exprimierenden Plasmids optimiert werden konnte (Seibler, 1999), wurde im folgenden versucht, Austauschereignisse durch Verwendung einer zusätzlichen Anreicherungsstrategie zu erzielen. Der Versuch der Anreicherung mit der Rekombinase transfizierter Zellen über gleichzeitige Expression des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) und FACS-Sortierung oder Coexpression eines Eisen-Ionen bindenden

Oberflächenmarkers und magnetische Sortierung blieb jedoch aufgrund unzureichender Expression von RFP bzw. der Rekombinase in den hierfür generierten Plasmiden erfolglos. Hingegen konnte in zwei unterschiedlichen Klongemischen der Austausch gegen ein das Fusionsgen *βgeo* exprimierendes Austauschplasmid durch Verwendung zweier Anreicherungsstrategien erfolgreich durchgeführt werden. Zum einen wurde auf Verlust der genomisch verankerten GTN-Kassette hin mit Ganciclovir selektiert, zum anderen wurden erfolgreich transfizierte Zellen über FACS-Sortierung angereichert, da ein Fusionsgen aus Flp-Rekombinase und eGFP verwendet wurde (Abb. 2.25A). Die FACS-Sortierung war aufgrund der sehr niedrigen eGFP-Expression der Klongemische möglich (Abb. 2.25B). Durch Überprüfung der β -Galaktosidase-Expression in den Ganciclovir-sensitiven und -resistenten Klonen der Gemische (Tab. 2.12) wurden Austauschfrequenzen von 35% bzw. 56% errechnet. Dies zeigt, dass Flp-RMCE auch in der Zelllinie CHO K1 prinzipiell möglich ist, jedoch muss aufgrund der hohen unspezifischen Rekombinationswahrscheinlichkeit neben der Negativselektion eine weitere Anreicherungsstrategie angewendet werden.

Cre-Rekombination in ES-Zellen wurde beispielsweise über transiente Puromycin-Selektion angereichert (Taniguchi et al., 1998). Auch die Effizienz von Flp-vermitteltem RMCE kann durch diese Strategie in ES-Zellen optimiert werden (Bode et al., im Druck). Ob die transiente Puromycin-Selektion jedoch auch in anderen Zelllinien funktioniert, wurde bisher nicht untersucht.

Effizienter Austausch ist weiterhin über kombinierte Positiv-/Negativselektion möglich (Seibler et al., 1998). Ein exprimierter Positivselektionsmarker ist nicht wünschenswert, da er mit der Expression anderer Gene interferieren kann (Fiering et al., 1993; Pham et al., 1996) und somit die Untersuchung der Wirkung cis-agierender Elemente auf ein Reportergen erschwert. Maximale Effizienz kann über die Verwendung eines ‘Promotor Traps’ erzielt werden, bei dem das Austauschplasmid neben einem einzubringenden Gen einen Promotor und ein ATG Startcodon enthält, welche die Expression eines genomisch verankerten defizienten Selektionsmarkers ermöglichen (Verhoeyen et al., 1998).

Da mit dem beschriebenen RMCE-System keine Austauschklone generiert werden konnten, war es nicht möglich, die Wirkung von S/MARs und Insulatoren im gleichen Integrationsort zu untersuchen. Des weiteren konnte nicht bestimmt werden, ob die Wirkung der S/MAR-Elemente durch einen ‘Targeting’-Effekt verursacht wird. Im folgenden Kapitel sollen alternative RMCE-Strategien diskutiert werden, welche aufgrund dieser Erfahrungen in

Zukunft eine Analyse dieser Elemente vor dem gleichen genomischen Hintergrund ermöglichen.

3.4.6 Alternative RMCE-Strategien in CHO-Zellen

Wie in Kap. 2.3.5 gezeigt, ist der Flp-vermittelter Kassettenaustausch in CHO-Zellen prinzipiell durchführbar, vorausgesetzt es werden zwei parallele Anreicherungsstrategien verwendet. Die Möglichkeit der sequenzspezifischen Integration beliebiger Transgene in genomische Loci mit charakterisierten Expressionseigenschaften ist in biotechnologisch relevanten Zelllinien wie CHO von großer Bedeutung. Bei der biotechnologischen Produktion von Pharmazeutika können Produzentenklone mit hoher und stabiler Expression aus Transfektionsgemischen bislang nur durch aufwändiges Screening isoliert werden. Die Einbringung des zu exprimierenden Gens in einen Locus mit bestimmten vorcharakterisierten Eigenschaften bezüglich Höhe und Stabilität der Expression ist daher wünschenswert. Zudem ermöglicht RMCE die Integration des interessierenden Gens in Abwesenheit eines exprimierten Selektionsmarkers.

Bei dem Entwurf eines Konzepts für die wiederholte Nutzung hochexprimierender Referenzintegrationsstellen in CHO-Zellen durch Flp-vermittelten RMCE sind folgende Überlegungen zu berücksichtigen:

1. Aufgrund der hohen Spontanresistenz von CHO-Zellen ist das Auffinden von Einzelkopieklonen, in welchen ein Kassettenaustausch möglich ist, sehr aufwändig. Durch einen Austausch im Klongemisch, dessen Durchführbarkeit in Kap. 2.3.6 gezeigt wurde, können RMCE-fähige Einzelklone isoliert werden.
2. Die hohe Rekombinogenität der Zelllinie erfordert mehrere parallele Strategien für die Anreicherung des Austauschereignisses. Neben Negativselektion auf den Verlust des Parental-Konstrukts hin und Sortierung auf transiente Rekombinaseaktivität mithilfe eines Fluoreszenzmarkers auf dem Rekombinaseplasmid ermöglicht Positivselektion auf ein einzubringendes Resistenzgen eine weitere effiziente Anreicherung. Allerdings ist hier zur Vermeidung der Anreicherung unspezifischer Integrationsereignisse die Verwendung einer Selektionsfalle notwendig. Durch Anbringung des Promotors außerhalb der von FRT-Sites flankierten Parentalkassette wird ein Positivselektions-

marker auf dem Austauschplasmid nur nach sequenzspezifischer Integration aktiviert. Der Aktivierung des promotorlosen Resistenzgens durch endogene Promotoren bei zufälliger Integration ins Genom kann durch einen auf dem Vektorrückgrat des Austauschkonstrukts gelegenen Negativselektionsmarker entgegengewirkt werden. Ein Austausch des Promotors ist somit nicht möglich, jedoch ist seine Beibehaltung ohnehin bei der wiederholten Nutzung einer hochexprimierenden Referenzintegrationsstelle sinnvoll, da die Expressionseigenschaften durch die Kombination aus Integrationsstelle und Promotor bestimmt werden. Nach Austausch von Reporterkassetten mit unterschiedlichen Promotoren in NIH-3T3-Zellen veränderte sich die relative Expressionshöhe (Seibler, 1999). Hingegen führte die Beibehaltung des Promotors zu einer vorhersagbaren Transgenexpression in vorcharakterisierten Integrationsstellen (Schübeler et al., 1998).

3. Für die Isolierung hochexprimierender Klone aus den RMCE-fähigen Zellen müssen diese ein Reportergen wie eGFP enthalten, welches eine Sortierung auf Hochexpression hin erlaubt. Zudem ermöglicht eGFP eine Analyse der Langzeitstabilität der Expression.
4. Integrationsstellen RMCE-kompetenter Einzelklone sollen wiederholt durch RMCE ansteuerbar sein, um in weiteren Schritten beliebige Gene einbringen zu können.

Abb. 3.2 stellt schematisch eine auf diesen Überlegungen basierende Strategie zur Isolierung hochexprimierender und durch RMCE wiederholt nutzbarer Klone vor. Zunächst erfolgt ein Austausch in einem Klongemisch, welches den von heterospezifischen FRT-Sites flankierten Positiv-/Negativselektionsmarker *hyg^rtk* exprimiert. Um gezielt Klone zu identifizieren, in welchen RMCE durchgeführt werden kann, wird zunächst ein erster Austausch gegen ein eGFP-*neo^r*-Fusionsgen im Klongemisch durchgeführt. Die Anreicherung kann über drei Strategien erfolgen: Negativselektion mit Ganciclovir auf Verlust des *hyg^rtk*-Gens hin, FACS-Sortierung zur Anreicherung Flp exprimierender Zellen, da die Rekombinase mit eGFP fusioniert ist und die eGFP-*neo^r*-Kassette des Austauschkonstrukts transient nicht exprimiert wird, und Positivselektion mit G418 auf Integration des Austauschplasmids hin. Da das eGFP-*neo^r*-Fusionsgen erst nach sequenzspezifischer Integration unter die Kontrolle des außerhalb der F3-Site gelegenen Promotors gerät, ist die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung unspezifischer Integrationsereignisse stark herabgesetzt. Eine Aktivierung des Gens durch kryptische Promotoren bei zufälliger Integration kann durch eine auf dem

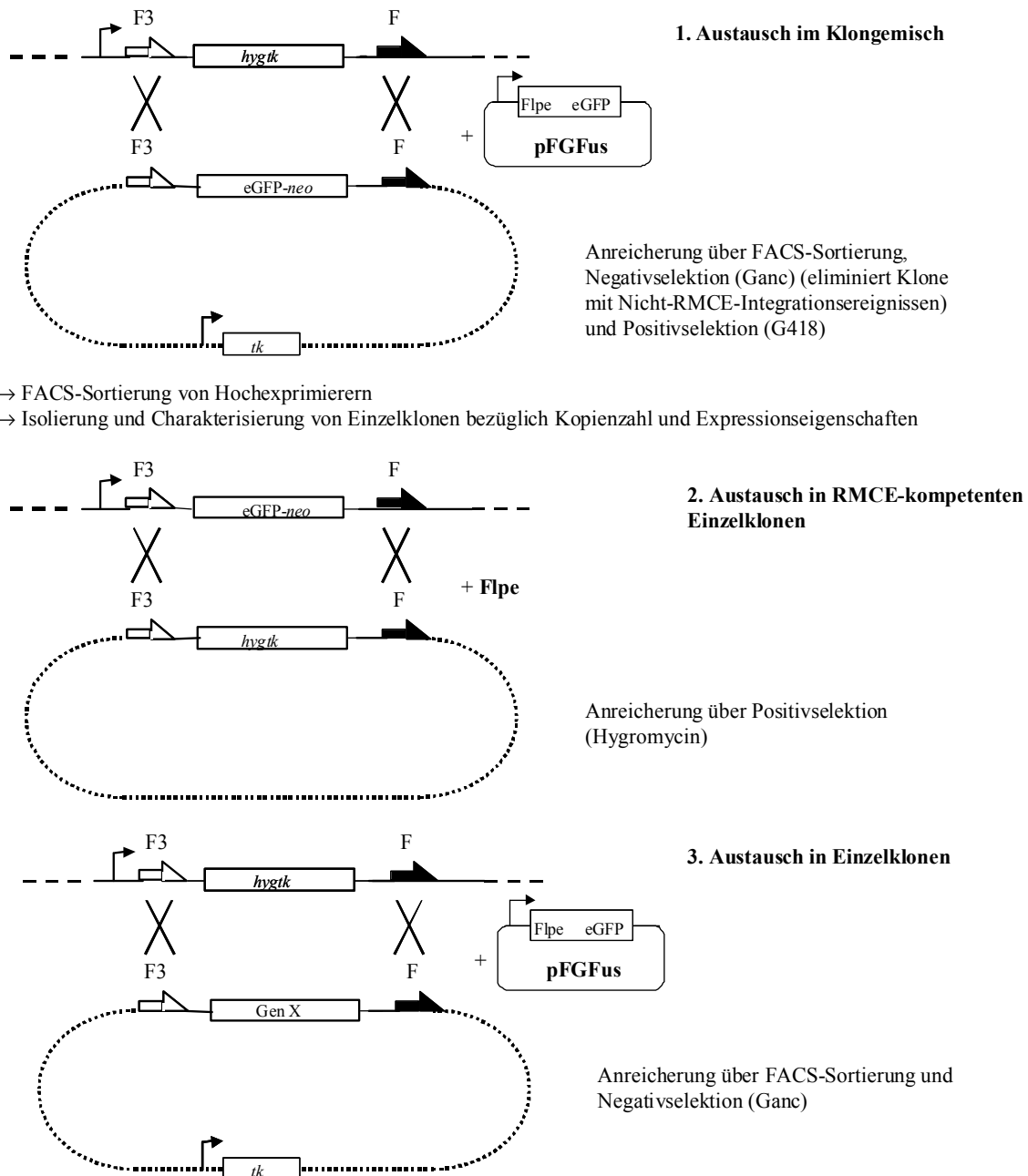


Abb. 3.2: Strategie zur sequenzspezifischen Integration beliebiger Transgene in charakterisierte Loci in CHO-Zellen.

Der Promotor, dargestellt durch einen gewinkelten Pfeil, befindet sich außerhalb der FRT-Sites und wird nicht ausgetauscht. Bei Einbringung von Positivselektionsmarkern verhindert diese Selektionsfalle die Anreicherung unspezifischer Integrationsereignisse. Eine Aktivierung durch kryptische Promotoren bei nicht RMCE-vermittelten Integrationsereignissen kann durch Anbringen einer *tk*-Kassette auf dem Austauschvektor unterbunden werden und auch bei Schritt 3 die Effizienz erhöhen.

Zunächst erfolgt ein Austausch über maximal drei Anreicherungsstrategien im Klongemisch, um austauschbare Klone zu identifizieren. Danach werden Einzelklone isoliert und bezüglich Kopienzahl und *eGFP*-Expression charakterisiert. Um interessante Loci weiterhin nutzen zu können, muss der Ausgangszustand durch Integration der *hyg^rtk*-Kassette wieder hergestellt werden. Nun kann ein beliebiger Austausch über Anreicherung durch FACS-Sortierung und Negativselektion erfolgen.

Vektorrückgrat des Austauschkonstrukts vorhandene *tk*-Kassette unterbunden werden. Die erhaltenen Klone sollten RMCE-fähig sein und intakte Kopien des Transgens enthalten. Somit werden Klone, welche aufgrund von Inaktivierung oder Deletionen eine erhöhte Spontanresistenz besitzen, effizient eliminiert. Aus dem nach Selektion erhaltenen Klongemisch können nun optional durch FACS-Sortierung hochexprimierende Zellen herausortiert werden. Nach anschließender Isolierung von Einzelklonen werden diese bezüglich Kopienzahl und Expressionseigenschaften charakterisiert. In Einzelkopieklonen mit gewünschten Eigenschaften bezüglich Höhe und Stabilität der eGFP-Expression kann nun die Integrationsstelle wiederholt genutzt werden. Falls neben dem gewünschten zu integrierenden Gen kein Positivselektionsmarker exprimiert werden soll, muss zunächst der Ausgangszustand durch Einbringung von *hyg^rtk* und Anreicherung über Hygromycin-Selektion wieder hergestellt werden. In einem weiteren Austausch kann ein beliebiges pharmazeutisch relevantes Gen eingebracht werden. Dieser Austausch wird über Negativselektion und FACS-Sortierung angereichert.

Expressionsstudien cis-agierender Elemente im gleichen Integrationsort können mit diesem System nur durchgeführt werden, wenn sie sich im Austauschplasmid 3' des Reportergens befinden. In 5' Position können keine Sequenzen inseriert werden, da sich der Promotor außerhalb der F3-Site befindet. Eine Untersuchung flankierender Elemente ist jedoch möglich, wenn der Promotor von loxP-Sites flankiert ist und durch die Cre-Rekombinase nach dem zweiten Austausch exzidiert wird. Nachfolgend kann ein Austauschplasmid mit einem Promotor-getriebenen Reporter und cis-agierenden Elementen in beliebiger Position eingebracht werden.

3.5 Die S/MAR- und Insulator-Wirkung wird von der Anwesenheit des SV40-Enhancers und von der Zelllinie beeinflusst

Da nicht auszuschließen ist, dass die relativ geringen Expressionsunterschiede der Klone mit den unterschiedlichen flankierenden Sequenzen (S/MAR, Insulator und Lambda-Kontrolle) auf eine dominante Transkriptionsaktivierung durch den starken SV40-Enhancer zurückzuführen sind, wurde der Effekt dieser Elemente auf Höhe und Langzeitstabilität der Expression in Klongemischen auch in Abwesenheit des Enhancers untersucht. Hierfür wurden neben

CHO-K1-Zellen auch NIH-3T3-Zellen verwendet, um zu überprüfen, ob die Wirkung der cis-agierenden Sequenzen durch die Zelllinie beeinflusst wird.

Zunächst wurden die Klonzahlen als Maß für die initiale Ermöglichung der Expression nach Integration der verschiedenen Konstrukte bestimmt (Abb. 2.27A). In beiden Zelllinien erhöht in Anwesenheit des Enhancers die Flankierung der Expressionskassette grundsätzlich die Klonzahl im Vergleich zum nicht flankierten Grundkonstrukt, wobei nur geringe Unterschiede bei den unterschiedlich flankierten Konstrukten festzustellen sind. Dies spricht dafür, dass der größere Abstand zum umliegenden Chromatin zunächst Expression ermöglicht, weil negative Chromatineinflüsse den Promotor nicht so schnell inaktivieren können wie ohne Flankierung. In Abwesenheit des Enhancers ist dieser Effekt in CHO-K1-Zellen verstärkt und besonders deutlich bei Flankierung mit den S/MAR-Elementen, welche eine 20fache Erhöhung der Klonzahl gegenüber dem Grundkonstrukt und eine dreifache gegenüber dem Lambda-Kontrollkonstrukt bewirken. In NIH-3T3-Zellen hingegen sind ohne Enhancer nicht so deutliche Effekte festzustellen, hier erhöhen die Insulatoren die Klonzahl leicht.

Die Auswirkungen der flankierenden Sequenzen auf die Höhe der eGFP-Expression sind in den CHO-K1-Klongemischen mit Enhancer (Abb. 2.27B) identisch mit den in Einzelkopieklonen beobachteten Effekten (Tab. 2.8). Dies zeigt, dass per Elektroporation generierte Klongemische aufgrund der niedrigen Kopienzahl integrierter Konstrukte (Baer et al., 2000) verlässliche Expressionsdaten liefern. Die Lambda-Kontrollsequenzen haben eine leicht reprimierende Wirkung auf die Expressionshöhe. Dies kann durch die stärkere Methylierung prokaryontischer Sequenzen begründet sein (Bestor, 1990). In Abwesenheit des Enhancers zeigt sich ebenso wie bei den Klonzahlen ein deutlicher transkriptionsaktivierender Effekt der S/MAR-Elemente. Die S/MAR-Elemente können also auch in Abwesenheit eines Enhancers wirken, während dies bei dem cHS4-Insulator nicht der Fall ist. Die starke Transkriptionsaktivierung des SV40-Enhancers reduziert offensichtlich den S/MAR-Effekt. In NIH-3T3-Zellen hingegen ergeben sich in An- und Abwesenheit des Enhancers keine deutlichen Effekte der unterschiedlichen flankierenden Elemente auf die Höhe der eGFP-Expression.

Auch die Untersuchung der Langzeitstabilität belegt differentielle Auswirkungen der flankierenden Sequenzen in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Anwesenheit des Enhancers (Abb. 2.28). In CHO-K1-Zellen verhindert Insulator- und Lambda-Flankierung

eine beim Grundkonstrukt beobachtete Reduktion der Expressionshöhe, während die S/MAR-Elemente E und W die komplette Inaktivierung der Expression einzelner Zellen fördern (Abb. 2.28A). Wie durch Untersuchungen an Einzelkopieklonen nahegelegt, ist dies wahrscheinlich auf eine erhöhte Rekombinogenität dieser Elemente zurückzuführen (siehe Kap. 3.4.4). Dass die S/MARs aber in CHO-K1-Zellen ohne Enhancer und in NIH-3T3-Zellen mit Enhancer im Gegensatz zu den anderen Elementen eine expressionsstabilisierende Wirkung haben, lässt darauf schließen, dass in CHO-K1-Zellen, welche Rekombinationsprozesse zu fördern scheinen (siehe Kap. 3.4.5), die Rekombinogenität durch Enhancer-Elemente verstärkt wird. Eine alternative Erklärung ist, dass die S/MAR-Elemente E und W in dieser Zelllinie langfristig mit der Enhancer-Funktion interferieren, was zum Expressionsverlust führt. Es ist gezeigt worden, dass Enhancer eine expressionsstabilisierende Wirkung erzielen, indem sie im Interphasekern eine Lokalisierung von Transgenen in die Nähe centromeren Heterochromatins verhindern (Francastel et al., 1999). S/MAR-Elemente hingegen binden an die Kernmatrix, wodurch möglicherweise ebenfalls Inaktivierungsprozesse verhindert werden. Es ist denkbar, dass diese unterschiedlichen „Lokalisierungsbestreben“ nicht miteinander kompatibel sind und daher ‘Silencing’ auftritt. In NIH-3T3-Zellen, in denen der Enhancer Expressionsverlust nicht entgegenwirkt, können die S/MAR-Elemente diesen verhindern. Mithilfe des Exzisionskonzepts konnte allerdings eine expressionsstabilisierende Wirkung der S/MAR-Elemente in einem Integrationsort in CHO-K1-Zellen nachgewiesen werden. Dies mag eine Funktion des speziellen Integrationsorts sein, andererseits wurden hier auch zwei S/MAR800-Elemente verwendet, deren Wirkung sich von denen des S/MAR E und insbesondere des S/MAR W unterscheiden kann. Für das S/MAR-Element aus dem Immunglobulin μ ‘heavy chain’ Locus wurde eine synergistische Expressionsaktivierung zusammen mit dem μ Enhancer beobachtet (Forrester et al., 1994). Möglicherweise können S/MARs jedoch die Funktion heterologer Enhancer nicht verstärken.

Das Insulator-Gemisch mit Enhancer weist in NIH-3T3-Zellen von Beginn der Kultivierung an ein biphasisches Expressionsmuster auf (Abb. 2.28B), was auf einen stark reprimierenden Einfluss dieses Elements in einigen Integrationsorten hindeutet. Insgesamt scheint das cHS4-Element in dieser Zelllinie keinen von negativen Chromatineinflüssen abschirmenden Einfluss auszuüben (Abb. 2.27 und 2.28B).

Die Expressionsstudien der Klongemische belegen, dass die Funktion der S/MAR-Elemente E und W sowie des cHS4-Insulators stark kontextabhängig ist. Zudem werden die unterschied-

lichen Parameter wie Ermöglichung der *neo^r*-Expression, Höhe und Stabilität der eGFP-Expression offensichtlich unterschiedlich beeinflusst. Eine durchgängig aktivierende Wirkung auf alle drei Parameter zeigen die S/MAR-Elemente in Abwesenheit des Enhancers in CHO-K1-Zellen und in geringerem Maß der Insulator in der gleichen Zelllinie in Anwesenheit des Enhancers. Eine Abhängigkeit der Wirkung des S/MAR E von der Zelllinie wurde schon in einer früheren Arbeit beobachtet (Klehr et al., 1991). In BHK-Zellen bewirkte dieses Element eine 18fache Expressionssteigerung, während die Expression in LTK- -Zellen nur um das vierfache erhöht wurde. Des weiteren wirken das *hsp70*- und das Histon-S/MAR aus *Drosophila*, welche in HeLa- und L-Zellen die Expression erhöhen (Poljak et al., 1994), in CHO-Zellen nicht (Zahn-Zabal et al., 2000). Jedoch verstärkte hier das A-Element aus der Lysozym-Gendomäne des Huhns die Expression. Dies spricht dafür, dass S/MAR-Elemente über die Interaktion mit zellspezifischen Faktoren wirken.

3.6 Mechanismen der S/MAR-Wirkung

Mit den verschiedenen Untersuchungssystemen wurden unterschiedliche Wirkungen von S/MAR-Elementen auf die Reportergenexpression beobachtet. Während die Daten der Klongemische mit dem Luziferase-Reporter und der Einzelklone und Klongemische mit dem GTN-Fusionsgen auf eine überwiegend transkriptionsaktivierende Rolle der S/MAR-Elemente hindeuten, sprechen die Exzisionsdaten für eine sowohl von reprimierenden als auch von aktivierenden Einflüssen abschirmende Rolle. Diese wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die S/MAR-Elemente E und W die Variation der Expressionshöhe von Einzelkopieklonen im gleichen Maß wie der cHS4-Insulator verringern. Es ist wahrscheinlich, dass S/MARs, welche sich wie das S/MAR E an der Grenze von Gendomänen befinden, ebenso wie Insulatoren die korrekte Regulation der Gene innerhalb der Domäne gewährleisten. Die transkriptionsaktivierende und die abschirmende Rolle widersprechen sich nicht, sondern sind auf die unterschiedlichen Untersuchungsansätze zurückzuführen. Es ist denkbar, dass S/MARs in den meisten Integrationsorten aktivierenden Einfluss ausüben, was durch Expressionsanalysen in zufälligen Loci sichtbar wird. Die durch die Exzisionsanalysen gezeigte Reprimierung, welche wahrscheinlich durch Abschirmung von aktivierenden Chromatinsequenzen hervorgerufen wird, scheint eine auf einzelne Loci beschränkte Wirkung

zu sein. In dieser Arbeit wurde sie zwar in 40% der untersuchten Integrationsorte beobachtet, in einer früheren Arbeit wurde jedoch bei Anwendung des gleichen Konzepts kein solcher Integrationsort getroffen (Seibler, 1999). Um eine statistische Aussage bezüglich der Häufigkeit der Integration in aktivierende Loci machen zu können, müsste eine größere Anzahl von Klonen untersucht werden.

Des weiteren stabilisieren S/MAR-Elemente die Langzeitexpression von Transgenen, wie anhand der Exzisionsdaten und der Analyse von Klongemischen mit dem GTN-Reporter gezeigt werden konnte. Dies war jedoch in CHO-K1-Zellen in Anwesenheit des SV40-Reporters aus in Kap. 3.5 diskutierten Gründen nicht der Fall.

Die Mechanismen der Wirkung von S/MAR-Elementen werden kontrovers diskutiert (Bode et al., 1998). Da S/MARs über ihre Bindung an die Kernmatrix definiert sind, ist es wahrscheinlich, dass ihre strukturelle Rolle mit ihrer funktionellen assoziiert ist. Eine direkte Korrelation zwischen Matrixbindungspotenzial und Transkriptionssteigerung konnte bestätigt werden (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1992; Allen et al., 1996), es ist jedoch nicht klar, ob Matrixbindung allein für die Aktivierung der Transgenexpression ausreicht (Phi-Van und Strätling, 1996). Das Auftreten von S/MAR-Elementen an der Grenze von Gendomänen (Übersicht in Mishra und Karch, 1999) spricht für eine die innerhalb der Domäne lokalisierten Gene abschirmende Funktion.

Weiterhin können durch die Bindung an die Kernmatrix, an welcher Transkriptionsprozesse ablaufen (Berezney et al., 1995), die Transgene in eine für Transkription günstige Umgebung gelenkt werden, was sowohl die Transkriptionserhöhung als auch die Langzeitstabilisierung erklärt. Schon in früheren Arbeiten wurde ein Einfluss von S/MAR-Elementen auf Acetylierungsprozesse deutlich. Klehr et al. (1992) und Schlake et al. (1994) beobachteten in Standard-Transfektionsexperimenten eine synergistische Wirkung zwischen S/MARs und dem Histondeacetylaseinhibitor Butyrat. Weiterhin fördern die S/MAR-Elemente des Ig μ Enhancers die Acetylierung von Histon H4 (Fernández et al., 2001). Kürzlich konnte eine direkte Beteiligung von S/MAR-Elementen an der Ausbildung offener Chromatinstrukturen nachgewiesen werden. Das S/MAR-bindende Protein SAF-A bindet den mit Acetyltransferase-Aktivität assoziierten Coaktivator p300 (Martens et al., 2002). Dies erklärt die Verhinderung positionsabhängiger Inaktivierung durch S/MAR-Elemente. Auch wurde gezeigt, dass S/MAR-Elemente DNA-Methylierung entgegenwirken (Fernández et al., 1998; Forrester et al., 1999; Dang et al., 2000).

Die Chromatin öffnende Wirkung von S/MAR-Elementen kann durch das Nicht-Histon Chromatin-Protein HMGI/Y reguliert werden. Histon H1 bindet kooperativ an S/MAR-Elemente (Käs et al., 1989), was zur Ausbildung einer dichteren Verpackungsstruktur führt. HMGI/Y verdrängt Histon H1 von S/MAR-DNA und bewirkt so die Öffnung der Chromatinstruktur (Käs et al., 1993).

Weiterhin ist es denkbar, dass S/MAR-Elemente die Transkriptionsrate erhöhen, indem sie die während der Transkriptionselongation von Polymerasen erzeugte positive Superhelizität durch ihre Neigung zur Strangtrennung entspannen und dadurch die Elongation erleichtern, wodurch weitere Polymerasen einen Initiationskomplex ausbilden können (Bode et al., 1998). Der häufig diskutierte 'Targeting'-Effekt von S/MAR-Elementen, d.h. die Lenkung der Integration von S/MAR-Konstrukten in Chromatinbereiche mit transkriptionsfördernden Einflüssen, kann ebenfalls die beobachteten expressionserhöhenden und –stabilisierenden Effekte erklären, scheint im Hinblick auf die Exzisionsdaten jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Fall nach Exzision der S/MAR-Elemente die Expression unverändert bleiben sollte.

Um eine genaue Aussage bezüglich der den beobachteten S/MAR-Wirkungen zugrunde liegenden Mechanismen treffen zu können, müssten weiterhin Analysen der Chromatinstruktur sowie des Histonacetylierungs- und DNA-Methylierungsgrads in S/MAR-haltigen und –freien Konstrukten durchgeführt werden.

3.7 Relevanz von S/MAR-Elementen für gentherapeutische und biotechnologische Anwendungen

Da S/MAR-Elemente eine hohe und stabile Transgenexpression gewährleisten können, bietet sich die Nutzung ihres Potenzials für vielfältige Anwendungen der modernen Molekularbiologie und Biotechnologie an. Beispielsweise konnte in CHO-Zellen der Anteil hochexprimierender Klone signifikant durch Flankierung eines Reporters mit dem Lysozym-S/MAR erhöht werden (Zahn-Zabal, 2001). Dieser Effekt wurde sogar durch Cotransfektion des S/MARs und des Expressionsplasmids erreicht.

Eine Limitation bei der Generierung transgener Mäuse ist die häufig beobachtete stochastische Inaktivierung von Transgenen (Martin und Whitelaw, 1996). Dieses Problem könnte möglicherweise durch S/MAR-Flankierung überkommen werden. Die 5'- und 3'-

S/MAR-Elemente aus dem humanen β -Interferon-Gencluster stimulieren zwar die Transgenexpression in frühen Embryonalstadien, in differenzierten Geweben jedoch ging dieser Effekt verloren (Thompson et al., 1994). Es ist denkbar, dass dies durch die in differenzierten Geweben geringere Konzentration von HMGI/Y begründet ist (siehe Kap. 3.6). Hingegen erhöhte die Anwesenheit von S/MAR-Elementen die Produktion transgener Antikörper in Mäusen (Castilla et al., 1998).

In transgenen Pflanzen können S/MAR-Elemente die Genexpression erhöhen und die Variabilität verringern sowie der Expressionsinaktivierung entgegenwirken. (Übersicht in Allen et al., 2000). Post-transkriptionelles ‘Silencing’ wird jedoch nicht durch S/MARs verhindert.

Insbesondere im Hinblick auf Gentherapieansätze zeigt die Verwendung von S/MAR-Elementen vielversprechende Ergebnisse. So verbessert das S/MAR800 die Expression retroviraler Vektoren in primären T-Zellen und Makrophagen entscheidend (Agarwal et al., 1998; Auten et al., 1999), da dieses Element die Methylierung des retroviralen 5’LTR verhindert (Dang et al., 2000) und somit eine wesentliche Einschränkung des Einsatzes retroviraler Vektoren überkommt.

Diese Untersuchungen zeigen das enorme Potenzial von S/MAR-Elementen in vielfältigen Anwendungen. Die erhöhte Rekombinogenität mancher Elemente (Bode et al., 2000b) kann eine Limitation ihrer Anwendung darstellen. Jedoch scheint dies kontextabhängig zu sein (Kap. 3.5). Durch geeignete Vortests der Rekombinogenität von Konstrukten wie in Bode et al. (2000b) beschrieben sowie SIDD-Analysen (Kap. 2.3.1) können potenzielle Bruchpunkte detektiert und anschließend aus den Vektoren eliminiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Tischzentrifugen

Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico

Eppendorf Centrifuge 5417 C

Hettich Rontanta/S

Kühlzentrifugen

Sorvall RC 5

Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco

Rotoren

SS34 und GSA

Speedvac concentrator

Savant Instruments Inc. mit Ölschieber-Vakuumpumpe und Kühlfalle

Photometer

Hitachi U-1100

Fluorometer

Hoefer TKO 100

Hoefer Dyna Quant 200

Scintillationszähler

Beckman LS 1701

Beckman LS 6500

Gelelektrophoresekammer

BRL Horizon 58

BRL Horizon 1114

BRL Horizon 2025

Owl Separation System, Model: A2

Mikroskop

Olympus CK 2

Leitz Labovort

Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung

UV-Kammer

Hanau

Phosphoimager & Auswertesoftware

Molecular Dynamics

Videograph

Biotec Fischer Video Densitometer

Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer

Fluoreszenz-Elisa-Reader

Millipore

Netzgeräte

Desaga Mains Power Supply Unit 1200/200

Biorad Power Pac 300

Durchfluscytometer und Auswertungssoftware

FACScan von Becton Dickinson

FACSCalibur von Becton Dickinson

Macintosh Quadra 650

Luminometer

Berthold Lumat LB 9501

Zellzähler

Schärfe System Casy 1

Zellkultur-Inkubatoren

Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336

Cleanbenches

Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400

Heraeus, HLB 2448

Heraeus, HSP 18

Elektrapette

Matrix Technologies

pH-Meter

Φ 50, Beckmann

Φ 340, Beckmann

PCR-Maschine

Biometra T3 Thermocycler

Thermomixer

Eppendorf Thermomixer 5436

Vortex

Scientific Industries Vortex Genie 2

Elektroporator

Biorad Gene Pulser und Pulse Controller

Hybridisierungsöfen

Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310

Stuart Scientific Hybridization Incubator

Laborschüttler

Heidolph

Wasseraufbereitungsanlage

Millipore Milli-Q

4.2 Material

Filterpapiere und Transferfolien

Sterilfiltration

Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm, d = 47 mm

Nylonmembran

Zeta-Probe, Fa. BioRad

Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall

Amersham Pharmacia Biotech Hybond-N+

Amersham Pharmacia Biotech Hybond-XL

Gene-Screen-Plus, Fa. DuPont

DEAE-Papier

Whatman 3MM

Autoradiographie

Expositionskammer

Molecular Dynamics Expositionskassetten für den Phosphorimager

Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitex, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB verwendet. Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler bezogen. Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma und USB. Oligonukleotidsynthesen und DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

Zellkulturmaterialien

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

Computerprogramme

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit den Programmen *Microsoft Word*, *Powerpoint* und *Excel* sowie *Picture It! Foto 2001* erstellt. *VCH Biblio 3.2* diente der Literaturverwaltung. Zur Literaturrecherche dienten *Medline*, *Current Contents* sowie *Current Contents Connect*.

Zur Durchführung von Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen wurden *Vektor NTI 4.0* und *5.0* von ATCC, die von C. Karremann entwickelten Programme *CUT* und *All In One* sowie *gcg* der Genetics Computergroup verwendet. Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics. Die Auswertung von FACS-Analysen erfolgte mit *Cell Quest 3.2.1* oder *3.3* auf Macintosh Rechnern.

4.3 Allgemeine Grundtechniken

(nach Sambrook et al., 1989)

4.3.1 Sterilisieren

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

Alle Lösungen werden sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren

Phenol (Fa. Roth): redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, Zusatz von 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0

Die wässrige Nukleinsäurelösung wird im Eppendorfgefäß mit 1 Volumen an Phenol versetzt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur besseren Phasentrennung wird 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt. Die Phasen werden durch eine kurze Zentrifugation getrennt. Phenolreste werden durch zweimaliges Extrahieren mit Chloroform/Isoamylalkohol beseitigt. Das durch Zugabe von 2 Volumen an Ethanol erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen.

4.3.3 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 2 Volumen 0,6 M LiCl in Ethanol, fällt für 10 Minuten bei 4°C und zentrifugiert anschließend 5 bis 30 Minuten mit 13000 UpM bei 4°C. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuum oder bei 37°C getrocknet.

Neben Ethanol kann auch Isopropanol zur DNA-Fällung benutzt werden, wobei das 0,6fache Volumen der DNA-Lösung eingesetzt wird.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.4.1 Photometrische Bestimmung

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35

μg RNA in 1 ml Volumen. Hierbei ist die optische Dichte der DNA-Lösung abhängig vom GC-Gehalt. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA mit einem 72%igen GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30%igen GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

4.3.4.2 Fluorometrische Bestimmung

Hoechstfarbstoff H33258

Kalbsthymus-DNA Standard : 100 $\mu\text{g/ml}$

10x TNE-Puffer : 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,4

Färbelösung : 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechstfarbstoff in 1x TNE-Puffer

Die Konzentration wird mit Hilfe eines Fluorometers ermittelt. Dazu werden 2 μl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml Färbelösung (vorgelegt in der Küvette) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgt durch 2 μl des DNA-Standards in 2 ml der Färbelösung.

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden.

4.4 Arbeiten mit *E.coli*

4.4.1 *E.coli*-Stämme

DH10B: F', mcrA Δ -(mrr hsdRMS-mcrBC), $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , *deoR*, *recA1*, *ara* $\Delta 139$, $\Delta(\text{ara, leu})7697$, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *end A1*, *nupG*

XL1-Blue : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' proAB, *lacI*^q ΔM15 , Tn10, (tet^r)], (Bullock, 1987)

4.4.2 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium : 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren.

TB-Medium : 12 g Bacto-Trypton, 24 g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml, autoklavieren; vor Gebrauch werden 100 ml steriles 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4 zugesetzt.

4.4.3 Herstellung von Agarplatten

Dem LB-Medium werden 15 g Agar pro Liter zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt. Zur Herstellung Kanamycin-haltiger Agarplatten wird 1/2000 Volumen Kanamycin einer sterilfiltrierten Stammlösung (100 mg/ml in H_2O) beigemischt

4.4.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 Minuten in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim ersten Mal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10%-igen Glycerin resuspendiert, wie beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.4.5 Elektrotransformation von *E.coli*

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit sehr hoher Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompetenten Bakterien bei 10^9 - 10^{10} Transformanten/ μg DNA.

Ein 50 μl -Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 μl einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem

elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4 und 5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 12,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenberg Röhrchen überführt und bei 37°C 20 bis 30 Minuten geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37°C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“-Plasmidpräparation charakterisieren.

4.4.6 Konservieren von Bakterienkulturen

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Eine langfristige Lagerung ist durch Vermischen einer 5 ml Übernachtskultur mit 87% Glycerin im Verhältnis 1:1 und Aufbewahren bei -20°C oder -70°C möglich.

4.5 Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der ‘Boiling Prep’-Methode (nach Dan Cimbor, FHCR, Seattle)

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli* Laborstämme (DH5 α , DH10B, XL1Blue), außer für CMK 603(recA+). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (basiert auf ‘Boiling Prep’ nach Holmes and Quigley).

STET:	für 500 ml
8% Sucrose	40g
0,5% Triton	12,5 ml Triton 20%
50 mM EDTA	50 ml 0,5 M EDTA
10 mM Tris (pH8)	5 ml 1 M Tris/HCl
LTE:	10 mg Lysozym / 1 ml TE
7,5 M NH ₄ Ac	

TER: 10 µg RNase A / 1 ml TE

Autoklavierte Zahnstocher

Eine *E.coli* 2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4 bis 16 h bei 37°C geschüttelt. Nach Umfüllen in 2,2 ml-Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei -20°C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90 Sekunden in einem Eppendorf Thermomixer bei 95°C inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH₄Ac und 500 µl Isopropanol zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 UpM pelletiert. Nach einem kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10 µg/ml) aufgenommen. Es werden 5 µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

4.5.2 "Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (Lysispuffer): 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3 (Renaturierungspuffer): 3,0 M NH₄OAc

Puffer QBT (Equilibrierungspuffer): 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol
0,15% Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer): 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol

Puffer QF (Elutionspuffer): 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15% Ethanol

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 200 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 UpM) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO₂. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschrte wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol entsalzt.

4.5.3 DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Anschließend wird die DNA mit TE oder H₂O eluiert.

Die zu isolierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt.

4.5.4 Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit'

Das Prinzip der Aufreinigung beruht ebenfalls auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern und kann für PCR-Fragmente einer Größe von 100 bp bis 10 kb verwendet werden. Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salze werden aus der Säule ausgewaschen. Anschließend wird die DNA mit Puffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) oder H₂O eluiert.

4.5.5 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen

Quick-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)

“Modified Bradleys” : 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS,
 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1,5 ml Eppendorfgefäße inkubiert man über Nacht bei 55°C. Anschließend wird die DNA durch vorsichtige Zugabe von 100% Ethanol mit 75 mM NaAc ohne Schütteln 2-3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 5000 UpM wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen zwei Waschschrte, bei denen das DNA-Pellet mit 0,5 ml 70% Ethanol für 30 Minuten stehengelassen und anschließend wie beim ersten Mal abzentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschrte lässt man das DNA-Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen und nimmt die DNA dann in 30 µl TE auf, so dass die DNA-Konzentration ca. 0,5 µg/µl beträgt. Die so erhaltene HMW-DNA kann direkt für den Restriktionsansatz und anschließende Southern Blot-Analysen eingesetzt werden, es empfiehlt sich der Einsatz von 8-10 µl DNA.

4.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

TEN: 40 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Mindestens 1×10^6 Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen und mit TEN geerntet. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten, 1000 UpM) kann das Pellet bei -70°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Isolierung von Gesamt-RNA:

Das Zellpellet wird mit 500 μl TRIZOL resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μl Chloroform mischt man kurz und lässt den Ansatz für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Zur Phasentrennung wird nun für 15 Minuten bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Ist die obere wässrige Phase klar, so wird sie vorsichtig abgezogen. Sollte sie nicht klar sein, muss der Ansatz noch weiter geschüttelt werden. 250 μl Überstand werden mit 250 μl Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird wiederum wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und die RNA, die als gelartiges Pellet erkennbar wird, mit 75% Ethanol gewaschen. Nun folgt ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 8000 g. Das Ethanol wird vorsichtig entfernt, die RNA 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 μl H_2O aufgenommen.

Isolierung von Gesamt-RNA nach dem '*NucleoSpin RNA IP*'-Protokoll (Macherey-Nagel):

Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf Lyse des Zellpellets, Inaktivierung von RNasen und Bindung der RNA an eine Silica-Membran. DNA-Kontaminationen werden durch DNaseI beseitigt. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschrte wird die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

4.6 DNA-Modifizierung

4.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37°C) gespalten. Nach Überprüfung der

Vollständigkeit der Spaltung wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA bzw. durch Phenolisierung gestoppt.

4.6.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 2 mM DTT

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3 mM in Wasser

In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 4 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1x Klenow-Puffer bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Phenol-Extraktion gestoppt und die DNA durch Fällung gereinigt.

4.6.3 Dephosphorylierung

10x Phosphatasepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 9, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂,

1 mM Spermidin

Um bei einer Ligation die Religation des Vektors zu verhindern, werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase = CIP) dephosphoryliert. Dazu wird in einem Reaktionsansatz von 100 µl Endvolumen 10 µl 10x Phosphatasepuffer und 20-100 pmol überstehende Enden mit 1-2 U Phosphatase 15 Minuten bei 37°C und anschließend weitere 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird kurz auf Eis gestellt und nach Zugabe von weiteren 1-2 U Enzym wird der Vorgang wiederholt. Der Reaktionsansatz wird phenolisiert und die DNA danach mit 0,6 M LiCl in Ethanol präzipitiert.

4.6.4 Ligation zur Transformation

5x Ligasepuffer : 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG 8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT

Ligation eines Inserts:

Ca. 20 fmol gespaltener und u.U. dephosphorylierter Vektor wird mit ca. 60 fmol Insert in 20 µl 1x Ligasepuffer mit 2 U T4-DNA-Ligase für mindestens 4 Stunden bei Raum-Temperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Für Klonierungen mit Oligonukleotiden werden 300pmol beider Oligos zunächst in 10 µl Wasser gemischt. Der Ansatz wird bei 70°C 5 Minuten denaturiert, dann wird langsam auf 35°C im Thermomixer abgekühlt. Zwischendurch erfolgen einige kurze Zentrifugationen. Die

Ligation erfolgt unter Verwendung des gesamten Ansatzes mit gespaltenem Vektor wie beschrieben.

4.7 Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.7.1 „Polymerase chain reaction“ (PCR)

(Saiki et al., 1988; Anwendungsbeispiele: Innis et al., 1990)

dNTP-Mix: je 2,5 mM aller vier Nukleotide (100 mM Stammlösungen; Pharmacia)

Die Polymerase Ketten Reaktion ist eine einfache aber effiziente Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Dazu muss lediglich die Sequenz der Grenzen des Segments zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert, danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegments sind, dann werden diese durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen verwendet man die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus*.

Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer möglicher Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man zusätzlich Polymerasen mit „proof reading“ Aktivität, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats sehr niedrig sein soll. Ein solches Korrekturleseenzym überprüft die von der Taq-Polymerase synthetisierten Sequenzen und verbessert eingebaute Fehler, was die Fehlerhäufigkeit auf 1/10 verringert. Mit einem solchen System können PCR-Produkte aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 15 kbp amplifiziert werden. Ein derartiges System findet in der ExpandTM Long Template PCR (Roche Pharma) seine Anwendung. Hier wird die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* als Korrekturleseenzym eingesetzt. Die Zusammensetzung des 10xPCR-Puffers ist hier:

13-22,5 mM MgCl₂, 500 mM Tris-HCl, pH 9,2 (25°C), 160 mM (NH₄)₂SO₄

Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende eine bis zu 10⁹fache Vermehrung des gewünschten Segments erreicht werden kann.

Ein typischer Reaktionsansatz wird in speziellen PCR-Reaktionsgefäßen folgendermaßen zusammengestellt:

1. Destilliertes, autoklaviertes Wasser wird so vorgelegt, dass ein Endvolumen von 40 µl erreicht wird.
2. 4 µl 10x PCR-Puffer
3. 4 µl dNTP-Mix
4. jeweils 20 bis 100 pmol der beiden Primer

Die Gefäße werden dann in den PCR-Heizblock überführt. Ein Übersichten der Reaktionsvorlage mit Mineralöl ist nicht nötig, da die verwendete PCR-Maschine eine Deckelheizung besitzt. Die Bohrungen des Gerätes können leicht mit Mineralöl befeuchtet werden, um einen optimalen Temperaturübergang zu gewährleisten. Nach dem Initiationsschritt (s.u.) wird die Reaktion gestartet durch Zufügen von

5. 10 µl Taq-Polymerase 1,25 U in 1x PCR-Puffer bzw.
10 µl Taq-/Pwo-Polymerase 2,625 U in 1x PCR-Puffer).

Ein typisches Temperaturprofil beginnt zunächst mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (4-6 min, 95°C). Dieser Schritt sollte nie ausgelassen werden, da die Anwesenheit der Polymerase bei niedrigeren Temperaturen bereits zu einer Verlängerung von fehlhybridisierenden Primern führt, die dann bei den folgenden Amplifikationszyklen als korrekte Templates benutzt werden und zu falschen Produkten führen. Danach wird auf 72°C bzw. 68°C (Taq-/Pwo-Polymerase) abgekühlt und die Polymerase hinzugefügt. Nun schließen sich die Temperaturzyklen an, die typischerweise 25- bis 35-mal wiederholt werden:

1. 94°-95°C 30-60 s
2. 40°-60°C 60 s
3. 72° bzw. 68°C 120-180s je nach Länge des Templates

Zu diesem generalisierten Versuchsprotokoll müssen noch einige Anmerkungen gemacht werden, da eine erfolgreiche Versuchsdurchführung von vielen Parametern abhängig ist und häufig einer auf die jeweilige Anwendung bezogenen Optimierung bedarf:

- Da sich die PCR-Methode zum Nachweis extrem geringer Konzentrationen spezifischer Sequenzen eignet, ist sie sehr anfällig gegen Kontaminationen mit anderen DNAs. Es muss daher auf möglichst langsames, aerosolfreies Pipettieren geachtet werden. Soweit wie möglich sollten alle verwendeten Lösungen vorher autoklaviert werden.
- Die angegebenen Konzentrationen sollten sehr genau eingehalten werden. Es empfiehlt sich daher, zunächst eine Reaktionsstammlösung anzusetzen und diese dann auf die einzelnen Proben zu verteilen, um Pipettierfehler zu minimieren.
- Die optimale Magnesiumkonzentration muss für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden. Ein Über- oder Unterschuss kann die Amplifikationseffizienz reduzieren oder zu unspezifischen Produkten führen.
- Der Nukleotid-Mix sollte nur aus vorneutralisierten Stammlösungen der Firmen Pharmacia, Roche Pharma oder USB zusammengestellt werden.
- Die einzelsträngigen Oligonukleotidprimer sollten 15 - 30 bp lang sein und besonders an ihrem 3'-Ende keine Komplementarität zu sich selbst oder zueinander aufweisen. Für eine maximale Spezifität sollte der GC-Gehalt bei etwa 50% liegen. Die Konzentration an Primern kann in dem angegebenen Bereich variieren; entscheidend ist, dass beide Primer in äquimolarem Verhältnis vorliegen. Dasselbe gilt für das Verhältnis der vier Nukleotide zueinander.
- Die Dauer der einzelnen Schritte der Temperaturzyklen kann leicht verändert werden. Die Laufzeit des Elongationsschrittes richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Man geht etwa von 1000 bp / min Synthesegeschwindigkeit aus. In vielen Fällen schließt man den Temperaturzyklen noch einen einzelnen Elongationsschritt von 7 bis 10 min bei 72°C bzw. 68°C an, um ein Fertigstellen noch nicht beendeter Sequenzen zu ermöglichen.

Anmerkung: Die PLATINUM[®] Pfx DNA-Polymerase (Stratagene) aus dem *Pyrococcus* sp. Stamm KOD besitzt eine 5'-3' Polymerase- und eine 3'-5' fehlerlesende Exonuklease-Aktivität. Verglichen mit der Taq-Polymerase wird die Fehlerhäufigkeit auf 1/48 verringert und ist daher besonders für die Amplifikation von zu klonierenden PCR-Fragmenten geeignet. Aufgrund eines gebundenen Antikörpers ist sie zunächst inaktiv und kann vor dem initialen Denaturierungsschritt in den Reaktionsansatz gegeben werden ('Hot Start'). Bei 94°C erfolgt die Aktivierung des Enzyms.

4.7.2 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma MWG durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion ('Comfort Read') wurden mindestens 5 µg Plasmid wie unter 4.3.3 beschrieben gefällt, gewaschen und getrocknet.

4.8 Radioaktive Nachweismethoden

4.8.1 Markierung von DNA

4.8.1.1 Random priming mit "Rediprime DNA Labelling System"

Labelling Mix

(Fa. Amersham Life Science) : dATP, dGTP, dTTP, exonukleasefreies Klenow-Enzym,
Oligonukleotidprimer (9mer)

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem Eppendorfgefäß für zehn Minuten bei 100°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix pipettiert, nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) gemischt und für 10-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Anschließend werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex-Säule abgetrennt.

4.8.1.2 Klenow-Markierung

Zur Größenbestimmung von Fragmenten im Southern Blot wird ein mit ³⁵S-dATP markierter Größenmarker (Lambda-DNA, HindIII und EcoRI verdaut) eingesetzt. Dazu markiert man die verdaute λ-DNA durch eine Auffüll-Reaktion mit dem Klenow-Enzym. Man versetzt den Verdauungsansatz (ca. 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl) mit 2 µl Nukleotid-Mix, 4 µl α -³⁵S-dATP (>1000 Ci/mmol) und 2 U Klenow. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und Abstoppen mit 20 µl Stop-Mix erfolgt die Aufreinigung über eine Sephadex G50 Säule.

4.8.2 'Southern Blotting'

(Southern, 1975)

4.8.2.1 Transfer

10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10-fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 20 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µl bei der spezifischen Temperatur des Enzyms inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8 bis 1,2%-igen TAE-Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard wird ein ³⁵S-markierter Verdau von Lambda-DNA verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten. Ebenso sollten zur Elektrophorese nur frisch angesetzte Puffer verwendet werden.

Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depurinieren werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in die Blotapparatur (z.B. eine Gelkammer) überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten ein Schwammtuch oder mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in 0,4 M NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 M NaOH angefeuchtetes und eine Lage trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. "Apura Swanex") die Anordnung ab.

Die Apparatur wird vorsichtig mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert, 30 Minuten bei 65°C gebacken und zur Hybridisierung weiter-

verwendet. Die Hybond-N+ bzw. Hybond-XL Membranen werden für zwei Stunden bei 80°C gebacken.

4.8.2.2 Hybridisierung

4.8.2.2.1 Hybridisierung mit Phosphatpuffer

(Church, G.M. et al 1989, leicht modifiziert)

Na _x H _x PO ₄ :	Na ₂ HPO ₄ (1M) und NaH ₂ PO ₄ (1M) werden im Verhältnis 4:1 vermischt (pH 7,2; sehr genaue Einstellung!)
Hybridisierungslösung	0,5M Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2
Prähybridisierungslösung:	Hybridisierungslösung + 7% SDS
SDS (20%)	
EDTA (0,5 M)	
Waschlösung I:	40 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 1% SDS 2 mM EDTA
Waschlösung II:	40 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 0,1% SDS 2 mM EDTA
Waschlösung III:	100 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 2 mM EDTA

Prähybridisierung und Hybridisierung:

5 ml der Hybridisierungslösung werden in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt und die mit H₂O angefeuchtete Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 68" C im Hybridisierungsofen für mindestens 10 Minuten. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, des weiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert und die Membran vorsichtig entnommen. Die folgenden Waschschrte erfolgen im Wasserbad bei 68° C.

2x 5 Minuten mit Waschlösung I

1x 5 Minuten mit Waschlösung II

3x 5 Minuten mit Waschlösung III zur Entfernung von SDS-Resten

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch mehrfaches Waschen in 0,1% SSC/0,5% SDS bei 95° C entfernt. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

4.8.2.2.2 Hybridisierung mit Dextransulfat-Hybridisierungslösung

Hybridisierungslösung 1 M NaCl
 50 mM Tris, pH 7,5 (bei 37°C)
 10% Dextransulfat
 1% SDS
 250 µg/ml Salmon Sperm DNA (sonifiziert)

in Aliquots à 20 ml bei –20°C aufbewahren

Waschlösungen 2x SSC / 0,5% SDS oder
 1x SSC / 0,1% SDS

Prähybridisierung und Hybridisierung:

20 ml der Hybridisierungslösung werden bei 65°C aufgetaut, für 10 Minuten aufgeköcht und wieder auf 65°C abgekühlt. Die Lösung wird in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt und die mit H₂O angefeuchtete Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 65° C im Hybridisierungsofen für mindestens 1,5 Stunden. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die

Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, des weiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert und die Membran vorsichtig entnommen.

Waschschritte:

1. 2x SSC / 0,5% SDS (ca. 250 ml)	5 min	RT
2. 2x SSC / 0,5% SDS (500 bis 1000 ml)	30 min	65°C
3. 2x SSC / 0,5% SDS (250 bis 500 ml)	5 min	65°C
bei zu erwartendem schwachen Signal		oder
1x SSC / 0,1% SDS (250 bis 500 ml)	30 min	65°C
bei zu erwartendem starken Signal		

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch Waschen unter den für die benutzte Membran angegebenen 'Strip'-Bedingungen entfernt. Für die Hybond-N+ bzw. die Hybond-XL Membran wird kochendes 0,5%iges SDS auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt, bis die Lösung abgekühlt ist. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

4.8.3 Northern Transfer

Das Formaldehyd-Agarosegel wird 5 Minuten in H₂O und anschließend zweimal 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt. Danach erfolgt der Aufbau der Blotapparatur analog zum Southern Transfer, allerdings erfolgt der Transfer in diesem Fall mit 10x SSC über Nacht. Als Membran dient eine Nylonfolie (GeneScreenPlus, NEN), die vor Gebrauch kurz in H₂O angefeuchtet wird. Nach dem Transfer wird die Membran mehrfach in 2x SSC geschwenkt,

zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier luftgetrocknet und anschließend 2 Stunden bei 80°C gebacken.

4.8.3.1 Hybridisierung von Northern Blots

Hefe-RNA: 1 g in 100 ml H₂O lösen, bei 4°C lagern; zum Gebrauch wird die Hefe-RNA 10 Minuten auf 100°C erhitzt und sofort in der Prähybridisierungslösung verdünnt (Endkonzentration 0,5 mg/ml).

Prähybridisierungslösung: 10% Dextransulfat (2 ml 50% Dextransulfat), 1% SDS (0,5 ml 20% SDS), 1 M NaCl, H₂O ad 9 ml; vor Gebrauch 0,5 ml denaturierte Carrier-DNA, sowie 0,5 ml denaturierte Hefe-RNA zufügen.

Hybridisierungslösung : ist die Prähybridisierungslösung, jedoch mit radioaktiv markierter Probe (ein Erneuern der Hybridisierungslösung ist unnötig); Probe vorher 10 Minuten auf 100°C erhitzen und dann sofort in der Hybridisierungslösung verdünnen.

Prähybridisierung:

Die Prähybridisierung erfolgt analog zu der für DNA-Blots, wird jedoch bei 60°C durchgeführt und sollte mindestens 20 Minuten dauern.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgt bei 60°C über mindestens 8 Stunden.

Waschen:

Nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung wird die Nylonfolie zunächst innerhalb des Röhrchens kurz mit 2x SSC gewaschen und dann aus dem Röhrchen in eine Instrumentenschale überführt. Anschließend wird die Membran für 5 Minuten in 2x SSC und dann mindestens zweimal für 15 Minuten mit einer auf 60°C vorgewärmten Lösung von 2x SSC/1% SDS gewaschen. Die Zahl der Waschschrte hängt von der mittels eines Handmonitors gemessenen Aktivität ab. Zum Abschluss erfolgt ein fünfminütiger Waschschrte mit 0,1x SSC. Der Blot wird nun in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert.

4.9 Gelelektrophorese

4.9.1 Agarose Gelelektrophorese

Laufpuffer (TAE): 40 mM Tris/Acetat (pH 7,5)
20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

5x Stop-Puffer: 15% Ficoll
50 mM EDTA
1x TAE
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylencyanol

Zur Anfertigung eines 1%igen Standardgels wird 1 g Agarose in 100 ml Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd so lange gekocht, bis keine sprudelnde Blasenbildung mehr zu beobachten ist. Dann wird die flüssige Agarose mit 1 μ l Ethidiumbromid (5 mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{5}$ Volumen des 5x Stop-Puffers versetzt, 10 Minuten auf 65°C erhitzt und aufgetragen. Für die Erkennung der Größe eines Fragmentes werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ungefähr 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 0,5-3-stündiger Laufzeit fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente können die Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Zum Nachweis sehr kleiner DNA-Fragmente steht hochgereinigte NuSieveTM-Agarose zur Verfügung, die die Herstellung von 10%igen Gelen mit einem Auflösungsvermögen von 20 bp-Fragmenten ermöglicht.

4.9.2 Formaldehyd-Agarosegele

10x MOPS: 0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM EDTA, 10mM NaOAc, pH 7

1,2 g Agarose werden in 72 ml H₂O durch Aufkochen gelöst und auf 55°C abgekühlt. Danach werden 10 ml 10x MOPS und 18 ml 37%ige Formaldehydlösung hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wird die Lösung in einen Gelträger überführt und für mindestens 1 h

polymerisiert. Die Elektrophorese wird bei 100V (oder 25V über Nacht) in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Als Größenstandard dient eine RNA-Leiter (0,24-9,5 kb, BRL).

4.10 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

4.10.1 Verwendete Zellen

1. CHO-K1: Chinese Hamster Ovary (ATCC 9618-CRL)
2. NIH 3T3: embryonale Mausfibroblasten-Zellen, ATCC CRL 1658
3. BN-R3: Derivat der Zelllinie BHK-A [Babyhamster-Nierenzellen, abgeleitet von BHK-21 (ATCC CCL 10. Macpherson und Stoker, 1962)], trägt eine Kopie eines retroviralen Konstrukts, bei welchem nach Flp-vermittelter Exzision ein defizientes *lacZ*-Gen unter die Kontrolle des LTRs gerät (Schübeler et al., 1998).

4.10.2 Medien und Lösungen

PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen; bei 4°C lagern.

TEP : 6 mM EDTA, 0,1-0,2% Trypsin (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100x): 1,212 g Ampicillin/200 ml (10000 U/ml), 2 g Streptomycin/200 ml (10 mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, bei -20°C lagern.

Glutaminlösung (100x) : 29,23 g Glutamin in 1 l lösen, bei -20 °C lagern

DME-Medium (Dulbecco's Modification of Eagles Medium; für NIH-3T3- und BN-R3-Zellen):

Man füllt Milliporewasser in 10 l Steilbrustflaschen, gibt die erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Fa. Flow) dazu und rührt mit einem Rührkern, bis das Medium vollständig gelöst ist. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO₃ wird das Medium in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen, und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Fertigstellung erfolgt bei Bedarf. Wenn nicht anders beschrieben, wird dem Medium kurz vor Gebrauch 10% FCS, 1/100 Volumen Glutaminlösung sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt und gut gemischt.

Medium für CHO-K1-Zellen:

Nut. Mix F-10 oder F-12 (HAM) mit Glutamax-1 (L-Alanyl-L-Glutamin), Fa. Gibco

Vor Gebrauch wird dem Medium 10%FCS sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt und gut gemischt.

4.10.3 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem nassbegasten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen werden die oben angegebenen Medien verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

4.10.4 Passagieren

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wird gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

4.10.5 Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 UpM (Hettich Rotanta/S). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5% DMSO aufgenommen und auf 3 bis 4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt.

Man belässt die Röhrchen maximal 60 Minuten auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C. Nach ca. 12 Stunden können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37°C-Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in

5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.10.6 Gentransfermethoden

4.10.6.1 Transfektion mittels Kopräzipitation

2x HEBS-Lösung : 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,1;
aliquotieren; bei -20°C lagern.

4 Stunden vor Zugabe der Präzipitate erfolgt ein Medienwechsel.

Die Präzipitate werden wie folgt hergestellt :

In einem ersten Röhrchen werden 100 µl 2x konzentrierten HEBS-Puffers vorgelegt (Gesamtvolumen je Präzipitat bei 9,1 cm²-Gefäßen beträgt 200 µl). In ein zweites Röhrchen pipettiert man 10 µl 2,5 M CaCl₂ sowie die DNA, füllt bis zum Endvolumen von 100 µl mit Wasser auf und tropft das CaCl₂-DNA-Gemisch unter Aufwirbeln des HEBS (Vortexen) in den Transfektionspuffer. Nach 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur hat sich das Präzipitat gebildet und wird auf die Zellen gegeben. Bei CHO-K1-Zellen sollte die Präzipitatbildung nur eine Minute dauern. Überschüssiges Präzipitat wird nach mindestens vier Stunden, spätestens nach einer Nacht von den Zellen entfernt (Medienwechsel). Optional kann vier Stunden nach der Transfektion zur Erhöhung der Transfektionseffizienz bei CHO-K1-Zellen eine Glycerolbehandlung der Zellen folgen (nach Jordan et al., 1996). Dazu werden 2 ml einer 20%-igen Glycerinlösung in PBS (sterilfiltriert) für eine Minute auf die Zellen gegeben. Anschließend werden 2 ml Medium hinzupipettiert, leicht geschwenkt, abgesaugt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt.

Für eine Zelldichte von 5x10⁵ Zellen pro 55 cm² Platte muss die DNA-Menge und das Präzipitationsvolumen erhöht werden. In diesem Fall beträgt das Volumen 1 ml.

4.10.6.2 Transfektion mittels ‘GenePORTER™ Transfection Reagent’ (Peglab)

GenePORTER™ Transfektions Reagenz: Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE)

Die Transfektionstechnik basiert auf einer direkten hydrophilen Konjugationstechnologie (‘DHC’).

Vier Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium.

Für die Transfektion von $2 - 5 \times 10^4$ Zellen werden 2 bis 4 μg DNA in 0,5 ml serumfreiem Medium aufgenommen. In einem anderen Gefäß werden 10 μl des GenePORTERTM -Reagenz ebenfalls in 0,5 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Unter Vortexen des GenePORTERTM -Reagenz wird die DNA zugegeben, etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach drei Stunden wird 1 ml Medium, das 20% FCS enthält, zugegeben. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

4.10.6.3 Transfektion mittels ‘GenePORTERTM2 Transfection Reagent’ (Peglab)

Vier Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel mit serumhaltigem oder – freiem Medium.

Für die Transfektion von 2×10^4 Zellen werden 2 μg DNA mit ‘DNA diluent’ auf ein Volumen von 50 μl verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. In einem anderen Gefäß werden 10 μl des GenePORTERTM2 -Reagenz mit 40 μl serumfreiem Medium gemischt. Die DNA-Lösung wird vorsichtig zu der GenePORTERTM2 -Lösung gegeben. Es wird nicht gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird die Mischung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

4.10.6.4 Transfektion mittels Elektroporation

Je nach Elektroporationsansatz wird das zu transfizierende Plasmid zuerst linearisiert oder zirkulär verwendet. Logarithmisch wachsende, halbkongruente Zellen werden mit TEP abgelöst, gezählt und in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 700 μl aufgenommen. 700 μl Zellsuspension (1×10^6 Zellen) wird in ein steriles Röhrchen gegeben und mit der nötigen Menge Plasmid vermischt. Anschließend wird der Ansatz in 0,4 cm sterile Plastikkuvetten pipettiert, die Kuvette in die Elektroporationskammer gestellt und die vorher ausgetestete, optimale Spannung und Stromstärke angelegt. Die normalen Bedingungen für CHO-K1-Zellen sind 800 μF und 360 V/cm, für NIH-3T3-Zellen 500 μF und 250 V/cm. Die behandelten Zellen werden umgehend mit Kulturmedium verdünnt und

ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt der erste Medienwechsel und ggf. dann oder nach 48 Stunden die Zugabe des Selektionsmediums.

4.10.7. Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion gewechselt. Am nächsten Tag werden die Zellen mindestens eins zu drei umgesetzt und mit Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-21 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als Mischung weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden.

CHO-K1-Zellen: 300 µg/ml G418, 5 µM Ganciclovir

NIH-3T3-Zellen: 700 µg/ml G418

BN-R3-Zellen: 1000 µg/ml G418

4.11 Magnetische Sortierung von Zellen mit dem MACSelect K^k.II-Kit (Miltenyi Biotech)

PBS ohne EDTA

TEP

FCS

PBE: PBS mit 5 mM EDTA

Muss vor der Sortierung entgast werden!

MACSelect K^k MicroBeads

Antikörper H-2K^k-FITC

EPICS/PI: PBS mit 10% FCS und 2 µM Propidiumiodid

Die zu sortierenden Zellen werden mit dem Vektor pMACS K^k.II transfiziert. Er kodiert das H-2K^k-Oberflächenantigen, welches Eisenionen aus dem Kulturmedium bindet. Zellen, die dieses Antigen exprimieren, werden über eine in einem Magnetfeld befindliche Säule abgetrennt. Zunächst muss der Zeitpunkt der höchsten Expression des Antigens in der

jeweiligen Zelllinie bestimmt werden. Dies geschieht über Bindung an einen FITC-gekoppelten Antikörper gegen H-2K^k, dessen Fluoreszenz im FACS gemessen werden kann. Die höchste H-2K^k-Expression findet in CHO-K1-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion statt.

Antikörperfärbung:

Die Zellen einer 9,1 cm² Kulturfläche werden zu ausgewählten Zeitpunkten nach der Transfektion mit PBS gewaschen, mit TEP abgelöst, in Medium aufgenommen 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wird in PBE resuspendiert und es folgt ein zweiter Zentrifugationsschritt unter den oben angegebenen Bedingungen. Das Pellet wird nun in 100 µl PBE resuspendiert und mit 10 µl der H-2K^k-FITC-Antikörperlösung versetzt. Nach Durchmischen erfolgt eine 5-10minütige Inkubation bei 2° bis 12°C im Dunkeln. Die Zellsuspension wird mit 2 ml PBE gewaschen und bei 1000 UpM 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden in 200 µl EPICS/PI aufgenommen und im FACS vermessen.

Magnetische Sortierung:

Zellen einer 9,1 cm² Kulturfläche werden an dem zuvor bestimmten Zeitpunkt der höchsten H-2K^k-Expression mit PBS gewaschen und mit 142 µl TEP abgelöst. Dann werden 28 µl FCS und 23 µl MACSelect K^k MicroBeads zugegeben und vorsichtig geschwenkt. Während einer anschließenden 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird noch zwei weitere Male vorsichtig geschwenkt. Die Suspension wird mit PBE (entgast) zu einem Endvolumen von 2 ml aufgefüllt und zur Vereinzelung der Zellen gut durchmischt. Eine MS⁺/RS⁺-Säule wird im Magnetfeld platziert und mit 500µl PBE gewaschen. Die Säule wird vier Mal mit 500 µl Aliquots der Zellsuspension befüllt, welche zuvor jeweils gut gemischt werden müssen. Nicht exprimierende Zellen laufen durch die Säule. Es folgen 4 Waschschrte mit je 500 µl PBE. Danach wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und auf einem Auffanggefäß gestellt. Die in der Säule befindlichen transfizierten Zellen werden in 2x 500 µl PBE mit einem Gummikolben herausgedrückt und nach Bedarf ausgesät.

4.12 Proteinanalytik

4.12.1 Nachweis für β -Galaktosidase

4.12.1.1 Färbung von Zellen

PBS : pH 7,1

Fixierlösung : 2% Formaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd in PBS

Färbelösung : 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 100 $\mu g/ml$ X-Gal
(Fa. Boehringer)

Die Einzelkomponenten werden als 100x Stocklösungen in PBS angesetzt und bei 4°C dunkel gelagert, bis auf X-GAL, welches in Dimethylformamid angesetzt und bei -20°C gelagert wird. Unmittelbar vor der Färbung werden die Einzelkomponenten in PBS verdünnt.

Die Zellen werden zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wird die Fixierlösung hinzugegeben und für zwei Minuten inkubiert. Diese wird abgesogen und einmal zügig mit PBS gewaschen. Ein weiterer Waschschriff mit 10 minütiger Inkubationszeit erfolgt. Anschließend wird die Färbelösung auf die Zellen gegeben. Die Färbereaktion erfolgt in einem feuchten Schrank bei 37 °C für mindestens 30 Minuten. Nach ca. 10 Stunden tritt keine weitere Färbung mehr auf. Die Zellen werden mit dem Lichtmikroskop betrachtet: Die blauen Zellen exprimieren β -Galaktosidase.

4.12.1.2 β -Galaktosidase aus Zellextrakten (MUG-Assay nach Kalos und Fournier, 1995; modifiziert)

Substratpuffer : 60 mM $Na_2H_2PO_4$, 40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM HCl, 1 mM $MgSO_4$,
50 mM β -Mercaptoethanol

MUG : 4-Methylumbelliferry- β -D-Galactosid), als Stock in Dimethyl-
formamid bei -20°C gelagert

Nahezu konfluente Zellen einer 9,1 cm² Kulturfläche werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEN geerntet. Nach dem Abzentrifugieren (5 Minuten, 1000 UpM, Hettich Rotanta/S) wird das Pellet in 200 μl Tris/HCl, pH 7,8, resuspendiert. Zellaufschluss erfolgt durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und folgendes Auftauen im 37°C Wasserbad (ein alternativer Aufschluss mit Triton ergibt deutlich geringere Ausbeuten). Die Zelltrümmer

werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 13000 UpM pelletiert. Der Überstand wird für die Messung eingesetzt. Dazu legt man je 20 µl Überstand bzw. geeignete Verdünnungen in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vor. Durch Zugabe von 200 µl Substratpuffer, dem zuvor 30 µg/ml MUG zugesetzt wurde, wird die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgt im Fluoreszenz-ELISA-Reader. Anregung bei $\lambda = 365$ nm. Gemessen wird die Emission bei $\lambda = 450$ nm in 5minütigen Intervallen. Um unabhängige Messungen vergleichen zu können, ist es erforderlich, eine Eichkurve mit dem aufgereinigten Enzym durchzuführen (β -Galaktosidase, Boehringer Mannheim).

4.12.2 Nachweis von Luziferase (Aktivitätstest nach Williams et al., 1989)

Luziferaseverdünnungspuffer: 0,5 M TRIS-Succinat (Fa. Sigma) auf pH 7,7 einstellen

Reaktionspuffer: 25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 5 mM ATP, 15 mM MgSO₄

Luziferinlösung: 0,2 mM Luziferin (D-Luziferin, synthetisch) in 25 mM Glycylglycin, pH 7,8

Die zu testenden Zellen lässt man in 6-Loch Platten konfluent wachsen. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit PBS gewaschen. Man gibt 1 ml TEN dazu, spült die Zellen mit einer Pipette ab und überführt die Suspension in ein Eppendorfhütchen. 50 µl der Zellsuspension werden im Zellcounter vermessen. Die restlichen Zellen werden durch Zugabe von 100-200 µl 250 mM Tris/HCl, dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C lysiert. Die Zelltrümmer werden 10 Minuten bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und vermessen.

In den Messröhrchen werden 20 µl Extrakt (u.U. auch mehr) zu je 350 µl Reaktionspuffer gegeben und sofort im Counter gemessen (10 Sekunden Integral). Der Injektor des Counters wird vorher mit Luziferinlösung gespült; in den Reaktionen werden 100 µl Luziferinlösung/Probe benötigt.

Die in 10 Sekunden gemessenen Lichtblitze werden auf die Zellzahl normiert.

4.12.3 Nachweis von GFP

4.12.3.1 ... im Fluoreszenzmikroskop

Zellklone oder Gemische können ohne Vorbehandlung auf dem Kulturgefäß unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 489 nm eine Eigenfluoreszenz einer Wellenlänge von 508 nm auf und gibt GFP-exprimierenden Zellen ein grünes Erscheinungsbild. Nach einer solchen Analyse können z.B. GFP-exprimierende Klone isoliert werden.

4.12.3.2 ... im FACS

EPICS: PBS 10% FCS

Gentamycin: Stock (10 mg/ml), im Medium 5 µl/ml

Propidiumiodid

Die Eigenfluoreszenz des GFP-Proteins erlaubt die Lebendanalyse der Expressionshöhe einzelner Zellen. Hierzu müssen nicht konfluente Zellen abtrypsinisiert und im EPICS-Puffer aufgenommen werden. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert und die Zellen werden anschließend in einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml in EPICS-Puffer aufgenommen. Die Zellen können so etwa eine halbe Stunde auf Eis ohne Schaden überstehen. Für eine Sortierung empfiehlt sich die Vereinzelung der Zellen, indem man die Zellsuspension durch eine feine Gaze laufen lässt. Damit nur lebende Zellen sortiert werden, wird Propidiumiodid zur Anfärbung toter Zellen in die Zellsuspension gegeben (2 µM). Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm eine Eigenfluoreszenz auf. Sortierte Zellen sollte vier Tage in Gentamycin-haltigem Medium kultiviert werden.

4.12.4 Nachweis von DsRed im FACS

Die Eigenfluoreszenz des Rot-fluoreszierenden Proteins wird analog zur GFP-Messung im FACS durchgeführt. Das Anregungsmaximum liegt bei 558 nm, allerdings kann zur Anregung auch ebenso wie bei GFP Licht einer Wellenlänge von 489 nm benutzt werden, während das emittierte Licht eine Wellenlänge von 583 nm besitzt.

5. Plasmide und Oligonukleotide

5.1 Plasmide

5.1.1 Verwendete Plasmide

ELu (Klehr, 1991): Wie Lu. 5' des SV40-Promotors befindet sich das 2,2 kbp große S/MAR-Fragment E aus dem 5'-Bereich des humanen β -Interferongens.

ELuW (Klehr, 1991): Wie ELu. 3' des Luziferasegens befindet sich das 1,3 kbp große S/MAR-Element W aus der Kartoffel.

Lu (Klehr et al., 1991; hier: pLu): Expressionsplasmid für Luziferase unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers. Als Selektionsmarker dient das Gen für die Neomycinphosphotransferase angetrieben vom Tk-Promotor.

8SVbg8 (Seibler, 1999; hier: 8SVbetageo8): Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase. Das Fusionsgen *betageo* steht unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers und ist von zwei gleich orientierten S/MAR800-Elementen eingerahmt. Das 5'-S/MAR ist von zwei gleich orientierten FRT-Sites, das 3'-S/MAR von zwei gleich orientierten loxP-Sites flankiert.

pBS377 (Gagneten et al., 1997): Expressionsplasmid für GFP unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors.

pBS500 (Gagneten et al., 1997): Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GFP und Cre-Rekombinase. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors.

pFIG (Iber et al., 1999): Expressionsplasmid für die Flp-Rekombinase und GFP. Die Verbindung des *flp*- und des *gfp*-Gens durch das IRES-Element des Poliovirus koppelt die Expression beider Gene.

Flpe (Schaft et al., 2001; hier: pCAGGS-FLPe): Expressionsplasmid für die Flpe-Rekombinase und die Puromycinacetyltransferase. Die Expressionen des Flpe- und des Puromycinresistenz-Gens sind durch das EMCV-IRES-Element gekoppelt. Die Gene stehen unter der Kontrolle des 'chicken β -actin'-Promotors und des CMV-IE-Enhancers, welcher sich 5' des Promotors befindet.

pDSRed1-N1 (Clontech): Expressionsplasmid für das Rot-fluoreszierende Protein DsRed. Das Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers. Da sich 5' des Leserasters ein Polylinker befindet, können N-terminale Fusionen durchgeführt werden.

pMACS K^k.II (Miltenyi Biotech): Expressionsplasmid für das H-2K^k-Oberflächenantigen, welches für magnetische Sortierung von Zellen verwendet wird. Das Gen steht unter der Kontrolle des H-2K^k-Promotors. Invers orientiert zu diesem befindet sich der SV40-Promotor/Enhancer und ein Polylinker zur Insertion beliebiger Gene.

F3TkEbgF (Seibler, unveröffentlicht): Expressionsplasmid für das Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase. Das Fusionsgen *betageo* steht unter der Kontrolle des Thymidinkinase-Promotor/Enhancers. Die Expressionseinheit ist von zwei gleich orientierten heterospezifischen FRT-Sites flankiert. 5' befindet sich eine Mutante der wt-Site, die F3-Site, und 3' die wt-Site.

pFGFus (Seibler, unveröffentlicht): Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus Flpe-Rekombinase und eGFP. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers.

F3MCSbpaF: Klonierungsplasmid, bei dem ein Polylinker und die Polyadenylierungsstelle aus dem bovinen Wachstumshormogen von gleich orientierten heterospezifischen FRT-Sites flankiert sind. 5' befindet sich eine Mutante der wt-Site, die F3-Site, und 3' die wt-Site. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Fiering, Dartmouth Medical School, Lebanon NH.

pSBC-1 (Dirks et al., 1993): Expressionsplasmid mit einem Polylinker zwischen dem SV40-Promotor/Enhancer und der IRES-Sequenz aus dem 5'UTR des Poliovirus.

pSBC-2 (Dirks et al., 1993): Expressionsplasmid mit einem Polylinker zwischen dem SV40-Promotor/Enhancer und dem SV40 Polyadenylierungssignal.

pSGTN (Unsinger, 2001): Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus eGFP, Thymidinkinase und Neomycinphosphotransferase. Das GTN-Gen steht unter der Kontrolle des SV40-Promotor/Enhancers.

pUC19-ST-LS1 (Willmitzer): Klonierungsplasmid, welches das 1,3 kbp große S/MAR-Element W aus dem ersten Intron eines lichtinduzierten Gens aus der Kartoffel enthält.

pTZE20 (Pucher, unveröffentlicht): Klonierungsplasmid, welches das 2,2 kbp große S/MAR-Element E aus dem 5' Bereich des humanen β -Interferongens in der EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pTZ18R (Pharmacia) enthält.

44x44: Klonierungsplasmid, welches zwei Dimere des 1,2 kbp großen cHS4-Insulator enthält. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Fiering, Dartmouth Medical School, Lebanon NH.

pLUEG (Unsinger, 2001): Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus Luziferase und eGFP. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers.

5.1.2 Hergestellte Plasmide

F3SGTNF: In den Vektor F3MCSbpaF wurde zwischen die Schnittstellen SapI und AflIII 3' der wt-FRT-Site ein Oligonukleotid eingefügt, welches Schnittstellen für die Restriktionsenzyme ClaI, PacI und SacII enthält, welche später zur Entfernung des Vektorrückgrats vor Elektroporation dienen können. Ein zweites Oligonukleotid mit den gleichen Schnittstellen wurde in den Vektor pSBC-1 zwischen die Schnittstellen AatII und

BpII eingebracht. Durch Ligation des Oligonukleotid-enthaltenden NheI/Eco31I-Fragments aus pSBC-1 und des Oligonukleotid-enthaltenden HindIII/Eco31I-Fragments aus F3MCSbpaF entstand ein Zwischenkonstrukt, in dessen NheI-Site der SV40-Promotor/Enhancer und das GTN-Gen aus pSGTN eingefügt wurden. In diesem Plasmid war zuvor der Polylinker zwischen der EcoRI- und der BamHI-Schnittstelle unter Verlust dieser Schnittstellen deletiert worden.

F3ESGTNWF: Das 1,3 kbp große S/MAR W aus dem Plasmid pUC19-ST-LS1 wurde zunächst durch Umklonieren mit flankierenden BglII-Schnittstellen versehen. Über diese wurde es in die BamHI-Schnittstelle des Vektors F3SGTNF 3' der wt-FRT-Site eingebracht. Das 2,2 kbp große S/MAR E aus dem Vektor pTZE20 wurde in die EcoRI-Site 5' der F3-Site eingebracht.

F3LSGTNLF: In die EcoRI-Site des Vektors F3SGTNF wurde ein 2,2 kbp großes Tsp509I-Lambda-Fragment eingefügt, in die BamHI-Site ein 1,3 kbp großes Sau3AI-Lambda-Fragment.

F3HSGTNHF: Das cHS4-Insulator-Dimer aus dem Vektor 44x44 wurde mit den Schnittstellen EcoRI und BamHI flankiert und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors F3SGTNF eingebracht.

F3SLGF: Das Luzi-eGFP-Gen aus pLUEG wurde als NheI/NotI-Fragment gegen das AvrII/NotI GTN-Fragment aus F3SGTNF ausgetauscht.

F3ESLGWF: Das NheI-Fragment mit SV40-Promotor/Enhancer und Luzi-eGFP-Gen aus F3SLGF wurde anstelle des NheI-Fragment mit SV40-Promotor/Enhancer und GTN-Gen in F3ESGTNWF eingebracht.

F3LSLGLF: analog zu F3ESLGWF

F3HSLGHF: analog zu F3ESLGWF

F3 Δ SGTNF: Der SV40-Enhancer wurde in pSBC-2 durch Schneiden mit NheI und NcoI und anschließendes Auffüllen und Religieren deletiert. Das NheI/PpuMI-Fragment mit dem SV40-Promotor wurde gegen das NheI/PpuMI-Fragment mit SV40-Promotor/Enhancer aus F3SGTNF ausgetauscht.

F3E Δ SGTNWF: Das SalI/MluI-Fragment mit dem SV40-Promotor aus F3 Δ SGTNF wurde gegen das SalI/MluI-Fragment mit SV40-Promotor/Enhancer aus F3ESGTNWF ausgetauscht.

F3L Δ SGTNLF: analog zu F3E Δ SGTNWF.

F3H Δ SGTNHF: Das EcoRI/BspEI-Fragment mit dem SV40-Promotor aus F3 Δ SGTNF wurde gegen das EcoRI/BspEI-Fragment (Partialverdau) mit SV40-Promotor-Enhancer aus F3HSGTNHF ausgetauscht.

F3ECGTNWF: Der ‘chicken β -actin’ Promotor aus Flpe wurde mit NcoI und XbaI ausgeschnitten und in das Plasmid pSBC-2, welches NheI/XhoI geöffnet wurde, eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde NheI/PpuMI geschnitten und der ‘chicken β -actin’ Promotor über die entsprechenden Schnittstellen in das Plasmid F3ESGTNWF eingebracht.

pFRFus: Die Plasmide pFGFus und pDSRed1-N1 wurden BamHI/NarI geschnitten und so zusammenligiert, dass das Flpe-Leseraster aus pFGFus an den N-Terminus des DsRed-Gens fusioniert wurde.

pMACS-Flpe: Das Flpe-Gen aus dem Vektor Flpe wurde mittels PCR mit den Primern flpsacI und flpbamHI amplifiziert und in den Vektor pMACS K^k.II über die Schnittstellen SacI und BamHI hinter den SV40-Promotor/Enhancer eingebracht.

Anmerkung:

Die Plasmide F3SGTNF, F3ESGTNWF, F3LSGTNLF, F3HSGTNHF und pFRFus wurden in Zusammenarbeit mit Kristina Nehlsen (GBF, Braunschweig) hergestellt (Nehlsen, 2000).

5.2 Oligonukleotide

5.2.1 Oligonukleotide zur Klonierung

Für die Klonierung des Grundkonstrukts F3SGTNF:

AatBpi

5'CATCGATTTAATTAACCGCGGCGATCGGGCGCGCCCACTTGGGCCGGCCCTGCA
GGATATC3'

BpiAat

5'AAGGGATATCCTGCAGGGCCGGCCACGTGCACCAAGTGGGCGCGCCCGATCG
CCGCGGTTAATTAAATCGATGACGT3'

SapAfl

5'GCTGATATCCTGCAGGGCCGGCCACGTGCCTGCAGGGGCGCGCCCGATCGCC
GCGGTTAATTAAATCGATA3'

AflSap

5'CATGTATCGATTTAATTAACCGCGGCGATCGGGCGCGCCCCTGCAGGCACGTGG
GCCGGCCCTGCAGGATATC3'

Zum Umklonieren des S/MAR-Elements W:

HindBam

5'AGCTTGAATTCCTGCAGGTCGACGGTACCGAATTCAGATCTG3'

BamHind

5'GATCCAGATCTGAATTCGGTACCGTCGACCTGCAGGAATTCA3'

5.2.2 PCR-Primer

Nachweis der 5' Intaktheit von F3ESGTNWF und F3LSGTNLF nach Integration:

BB4 5'TGACAGCTTATCGCGATAAGCTAGAGC3'
GFP6 5'ACACGCTGAACTTGTGGCCGTTACGTCGC3'

Nachweis der 3' Intaktheit von F3ESGTNWF und F3LSGTNLF nach Integration:

NEO5 5'CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG3'
BB3 5'GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGGCCGC3'

Nachweis der 5' Intaktheit von F3HSGTNHF nach Integration:

HS10 5'GGCTCTGACGCGCTGGGCTGCTGGTTGATG3'

Nachweis der 3' Intaktheit von F3HSGTNHF nach Integration:

HS9 5'GCATGGACGTGGACATGCAGGTGTTGAGGC3'

Interne PCR:

GFP7 5'CGACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC3'
NEO8 5'CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG

Primer für die Amplifikation des Flpe-Gens zur Klonierung von pMACS-Flpe:

flpsacI 5'CGAGCTCCCATGGCTCCCAAGAAGAAG3'
flpbamHI 5'CGGATCCTATATGCGTCTATTTATGT3'

6. Abkürzungen und Zeichen

A	Adenosin
α	alpha
Abb.	Abbildung
<i>amp</i>	Ampicillinresistenz-Gen
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
att	attachment
β	beta
<i>β-geo</i>	Fusionsgen aus dem <i>lacZ</i> -Gen und dem <i>neo^r</i> -Gen
bp	Basenpaare
BHK	Baby Hamster Kidney Zellen
BSA	Rinderserumalbumin
bpA	Polyadenylierungsstelle des bovinen Wachstumshormon-Gens
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cHS4	DNase I hypersensitive Site 4 aus dem β -Globingencluster des Huhns (auch 5'HS4)
CHO	Chinese hamster ovary Zellen
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus-Promotor
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
Cre	causes recombination (Cre-Rekombinase)
CTCF	CCCTC-binding factor
δ , Δ	delta
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DME	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunoassay
em	Emission
Enh	Enhancer
ES	Embryonale Stammzellen der Maus
ex	Extinktion
F	Wildtyp-FRT-Site
F3	Mutante der Wildtyp-FRT-Site
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	foetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLP	FLP-Rekombinase
FLPe	FLP enhanced
fmol	10 ⁻¹⁵ Mol
FRT	FLP-recognition-target
g	Gramm
G	Guanin
γ	gamma
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
GAL	β-Galactosidase
Ganc	Ganciclovir
GFP	green fluorescent protein
<i>gfp</i>	GFP-Gen
GTN	Fusionsprotein aus eGFP, Thymidinkinase und Neomycinphosphotransferase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-DNA	high molecular weight DNA
HS	DNase I hypersensitive Site
HSV-TK	Herpes simplex virus Thymidinkinase
<i>hyg^{tk}</i>	Fusionsgen aus dem <i>hyg</i> -Gen und dem <i>tk</i> -Gen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

Int	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -D-galaktopyranosid
IRES	internal ribosome entry site
Kap.	Kapitel
kb	1000 Basen
kbp	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
kV	1000 Volt
l	Liter
λ	Lambda
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase Gen
LCR	locus control region
LIS	Lithium-3',5'-diiodosalicylat
lox	loxP-Site
loxP	locus of crossing over of P1(Zielsequenz der Cre-Rekombinase)
LTR	long terminal repeat
Luzi	Luziferase
μ	My
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	mikromolar
M	molar
mA	Milliampère
MAR	matrix attachment region
MCS	"multiple cloning site"
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mod(mdg4)	modifier of mdg4
mRNA	messenger-RNA
ms	Millisekunden
MUG	4-Methylumbelliferyyl- β -D-Galactosid
nm	10 ⁻⁹ Meter

<i>neo</i>	Neomycin-Phosphotransferase Gen
NS	Nukleinsäuren
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
ori	origin of replication
p	Plasmid
Φ	Phi
PcG	polycomb-group
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	position effect variegation
pmol	10^{-12} Mol
RMCE	recombinase-mediated cassette exchange
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
S	Schwefel
SAR	scaffold attachment region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIDD	stress induced duplex destabilization
S/MAR	scaffold/matrix attachment region
sec	Sekunde
Su(Hw)	supressor of hairy wing
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tex	Transiente Expression
Tk	HSV-Thyminkinase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
trxG	trithorax-group
U	units, Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
UpM	Umdrehungen pro Minute

V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

7. Literatur

- Adachi, Y., Kas, E., and Laemmli, U. K.** (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* **8** (13), 3997-4006.
- Agarwal, M., Austin, T. W., Morel, F., Chen, J., Böhnlein, E. and Plavec, I.** (1998). Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells. *J. Virol.* **72** (5): 3720-3728.
- Allen, G. C., Hall, G. Jr., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K., and Thompson, W. F.** (1996). High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* **8**(5): 899-913.
- Allen, G. C., Spiker, S. and Thompson, W. F.** (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**: 361-376.
- Amati, B. and Gasser, S.M.** (1990). Nuclear scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5442-5454.
- Anderson, J. N.** (1986). Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucleic Acids Res.* **14** (21): 8513-8533.
- Antes, T. J., Namciu, S. J., Fournier, R. E. K. and Levy-Wilson, B.** (2001). The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry* **40**: 6731-6742.
- Armstrong, J. A., Emerson, B. M.** (1998). Transcription of chromatin: these are complex times. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 165-172.
- Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., Kahn, M. L., Kalionis, B., Narayana, S. V. L., Pierson III, L. S., Sternberg, N. and Leong, J. B.** (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5**: 433-440.
- Askew, G. R., Doetschmann, T., and Lingrel, J. B.** (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and exchange strategy. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4115-4124.
- Auten, J., Agarwal, M., Chen, J., Sutton, R. and Plavec, I.** (1999). Effect of scaffold attachment region on transgene expression in retrovirus vector-transduced primary T cells and macrophages. *Human Gene Therapy* **10**: 1389-1399.
- Baer, A., Schübeler, D. and Bode, J.** (2000). Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* **39**: 7041-7049.

- Baer, A. and Bode, J.** (2001). Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 473-480.
- Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G.** (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396.
- Bell, A. C. and Felsenfeld, G.** (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **9**: 191-198.
- Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G.** (1999). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* **291**: 447-450.
- Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J.** (1997). Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J. Mol. Biol.* **274**: 181-196.
- Berezney, R. and Coffey, D. S.** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **60**: 1410-1417.
- Berezney, R., Mortillaro, M. J., Ma, H., Wei, X. and Samarabandu, J.** (1995). The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int. Rev. Cytol.*: 1-65.
- Berger, S. L.** (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **12**: 142-148.
- Bestor, T. H.** (1990). DNA-Methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326**: 179-187.
- Bestor, T.** (1998). Methylation meets acetylation. *Nature*. **393**: 311-312.
- Bingham, P. M.** (1997). Cosuppression comes to the animals. *Cell* **90**: 385-387.
- Bode, J., Pucher, H. J. and Maaß, K.** (1986). Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon- β genes in a mouse host cell. *Eur. J. Biochem.* **158**: 393-401.
- Bode, J. and Maaß, K.** (1988). Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* **27**: 4706-4711.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh ,T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* **255**: 195-197.
- Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., and Klehr-Wirth, D.** (1995). Scaffold matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci. *Int. Rev. Cytol.* **162A**: 389-454.

- Bode, J., Stengert-Iber, M., Kay, V., Schlake, T. and Dietz-Pfeilstetter, A.** (1996). Scaffold/matrix-attached regions: Topological switches with multiple regulatory functions. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expression* **6**: 115-138.
- Bode, J., Bartsch, J., Boulikas, T., Iber, M., Mielke, C., Schübeler, D., Seibler, J., and Benham, C.** (1998). Transcription-promoting genomic sites in mammalia: their elucidation and architectural principles. *Gene Therapy and Molecular Biology* **1**: 551-580.
- Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C.** (2000a). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10** (1): 73-90.
- Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P.** (2000b). Fatal connections: When DNA ends meet on the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem. Supplement* **35**: 3-22.
- Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schübeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E. and Nikolaev, L.** (2000c). The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* **381**: 801-813.
- Bouhassira, E. E., Westerman, K. and Leboulch, P.** (1997). Transcriptional behaviour of LCR elements integrated at the same chromosomal locus by recombinase mediated cassette exchange. *Blood* **90**: 3332-3344.
- Bouffler, S. D., Morgan, W. F., Pandita, T. K. and Slijepcevic, P.** (1996). *Mutat. Res.* **366** (2): 129-135.
- Broach, R. J., Hicks and B. J.** (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* **21**: 501-501.
- Buchholz, F., Angrand P. O. and Stewart, A. F.** (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16**: 657-662.
- Buchholz, F. and Stewart, A. F.** (2001). Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution. *Nat. Biotechnol.* **19**: 1047-1052.
- Burdon, R. H., Qureshi, M. and Adams, R. L. P.** (1985). Nuclear matrix-associated DNA methylase. *Biochem. Biophys. Acta* **825**: 70-79.
- Castilla, J., Pintado, B., Sola, I., Sánchez-Morgado, J. M. and Enjuanes, L.** (1998). Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nature Biotechnol.* **16**: 349-354.
- Challita, P. M. and Kohn, D. B.** (1994). Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2567-2571.

- Chattopadhyay, S., Whitehurst, C. E. and Chen, J.** (1998). A nuclear matrix attachment region upstream of the T cell receptor β gene enhancer binds Cux/CDP and SATB1 and modulates enhancer-dependent reporter gene expression but not endogenous gene expression. *J. Biol. Chem.* **273** (45): 29838-29846.
- Chung, J. H., Whiteley, M. and Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken Beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* **74**: 505-514.
- Chung, J. H., Bell, A. C. and Felsenfeld, G.** (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 575-580.
- Cockerill, P. N. and Garrard, W. T.** (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**: 273-282.
- Cockerill, P. N., Yuen, M. H. and Garrard, W. T.** (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J. Biol. Chem.* **262**: 5394-5397.
- Cockerill, P. N.** (1990). Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2634-2648.
- Conklin, K. F. and Groudine, M.** (1986). Varied interactions between proviruses and adjacent host chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3999-4007.
- Craig, N.** (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 77-106.
- Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R. H. A., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D. and Cremer, C.** (2000). Chromosome territories, interchromatin domain, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **12** (2): 179-212.
- Cremer, T. and Cremer, C.** (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics.* **2** (4): 292-301.
- Dang, Q., Auten, J. and Plavec, I.** (2000). Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* **74**: 2671-2678.
- Davies, R. L., Fuhrer-Krusi, S. and Kucherlapati, R. S.** (1982). Modulation of transfected gene expression mediated by changes in chromatin structure. *Cell* **31**: 521-529.
- Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H. and Ow, D. W.** (2000). Transgene integration into the same chromosomal location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* **14**: 2869-2880.

- de Belle, I., Cai, S. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1998). The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *The Journal of Cell Biology* **141**: 335-348.
- Dernburg, A., Broman, K., Fung, J., Marshall, W., Philips, J., Agard, D. and Sedat, J.** (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* **85**: 745-759.
- Deaven, L. L., and Petersen, D. F.** (1973). The chromosomes of CHO, an aneuploid chinese hamster cell line: G-Band, C-Band and autoradiographic analyses. *Chromosoma* **41**: 129-144.
- Dickinson, L. A., Joh, T., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* **70**: 631-645.
- Dickinson, L. A., Dickinson, C. D., and Kohwi Shigematsu, T.** (1997). An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J. Biol. Chem.* **272** (17): 11463-11470.
- Dietz, A., Kay, V., Schlake, T., Landsmann, J. and Bode, J.** (1994). A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2744-2751.
- Dijkwel, P. A. and Hamlin, J. L.** (1995). Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. Structural and functional organization of the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.* **162A**: 455-484.
- Dirks, W., Wirth, M. and Hauser, H.** (1993). Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* **128**: 247-249.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan and Lathe, R.** (1997) Variegated gene expression in mice. *Trends in Genetics* **13**: 127-130.
- Donze, D. and Kamakaka, R. T.** (2001). RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **20**: 520-531.
- Dymecki, S.** (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6191-6196.
- Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J. and Stamatoyannopoulos, G.** (2000). A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (16): 9150-9155.
- Eszterhas, S. K., Bouhassira, E. E., Martin, D. I. K. and Fiering, S.** (2002). Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol. Cell. Biol.* **22** (2): 469-479.

- Fackelmayer, F. O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A.** (1994). Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur. J. Biochem.* **221**: 749-57.
- Felsenfeld, G. and McGhee, J. D.** (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* **44**: 375-377.
- Felts, K., Rogers, B., Chen, K., Ji, H., Sorge, J. and Vaillancourt, P.** Recombinant *Renilla Reniformis* GFP displays low toxicity. *Stratagene Strategies* **13**: 85-87.
- Feng, Y. Q., Seibler, J., Alami, R., Eisen, A., Westerman, K. A., Leboulch, P., Fiering, S. and Bouhassira, E. E.** (1999). Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J. Mol. Biol.* **292**: 779-785.
- Feng, Y. Q., Lorincz, M. C., Fiering, S., Grealley, J. M. and Bouhassira, E. E.** (1999). Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **21** (1): 298-309.
- Fernández, L. A., Winkler, M., Forrester, W., Jenuwein, T. and Grosschedl, R.** (1998). Nuclear matrix attachment regions confer long-range function upon the immunoglobulin μ enhancer. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* **LXIII**: 515-524.
- Fernández, L. A., Winkler, M., and Grosschedl, R.** (2001). Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin μ enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol. Cell. Biol.* **21** (1): 196-208.
- Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., Mamalaki, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M. and Kioussis, D.** (1996). Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* **271**: 1123-1125.
- Fiering, S., Kim, C., Epner E. and M. Groudine.** (1993). An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8469-8473.
- Finch, J. T. and Klug, A.** (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901.
- Fisher, P. A., Berrios, M. and Blobel, G.** (1982). Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina, and nuclear pore complexes from embryos of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* **92**: 674-686.
- Forrester, W. C., van Genderen, C., Jenuwein, T., and Grosschedl, R.** (1994). Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin μ gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* **265**, 1221-1225.

- Forrester, W. C., Fernández, L. A. and Grosschedl, R.** (1999). Nuclear matrix attachment regions antagonize methylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions. *Genes Dev.* **13**: 3003-3014.
- Foster, K. A. and Collins, J. M.** (1985). The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronised HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 4229-4235.
- Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M. and Martin, D. I. K.** (1999). A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell* **99**: 259-269.
- Friedrich, G. and Soriano, P.** (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* **5**: 1513-1523.
- Fukushige, S. and Sauer, B.** (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7905-7909.
- Gagneten, S., Le, Y., Miller, J. and Sauer, B.** (1997). Brief expression of a GFP*cre* fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Res.* **25** (16): 3326-3331.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I. K. and Whitelaw, E.** (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nature Genetics* **18**: 56- 59.
- Gasser, S. M. and Laemmli, U. K.** (1987). A glimpse at chromosomal order. *Trends in Genetics* **3**: 16-22.
- Gasser, S. M. and Laemmli, U. K.** (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**: 521-530.
- Gerasimova, T. I., Gdula, D. A., Gerasimov, D. V., Simonova, O. and Corces, V. G.** (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect-variegation. *Cell* **82**: 587-597.
- Gerasimova, T. I. and Corces, V. G.** (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* **92**: 511-521.
- Gerasimova, T. I., Byrd, K. and Corces, V. G.** (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol. Cell* **6**: 1025-1035.
- Gerasimova, T. I. and Corces, V. G.** (2001). Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 193-208.
- Geyer, P. K. and Corces, V. G.** (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* **6**: 1865-1873.

- Girard, F., Bello, B., Laemmli, U. K. and Gehring, W. J.** (1998). *In vivo* analysis of scaffold-associated regions in *Drosophila*: a synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation. *EMBO J.* **17** (7): 2079-2085.
- Grunstein, M.** (1990). Nucleosomes: regulators of transcription. *Trends-Genet.* **6**(12): 395-400.
- Grunstein, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352.
- Hall, Jr., G., Allen, G. C., Loer, D. S., Thompson, W. F., and Spiker, S.** (1991). Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9320-24.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. and Tilghman, S. M.** (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**: 486-489.
- Hartley, J. L. and Donelson, J. E.** (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* **286**: 860-865.
- Hendzel, M. J., Delcuve, G. P., and Davie, J. R.** (1991). Histone deacetylase is component of the internal nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **266**(32): 21936-42.
- Hendzel, M. J., Sun, J. M., Chen, H. Y., Rattner, J. B., and Davie, J. R.** (1994). Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **269**(36): 22894-901.
- Hirose, S., and Ohta, T.** (1990). DNA supercoiling and eukaryotic transcription--Cause and effect. *Cell Struct. Funct.* **15**: 133-135.
- Hoeben, R. C., Migchielsen, A. A. J., van der Jagt, R. C. M., van Ormondt, H. and van der Eb, A. J.** (1991). Inactivation of the Moloney Murine Leukemia Virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *Journal of Virology* **65**: 904-912.
- Hoess, R. H., and Abremski, K.** (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* **181**: 351-362.
- Iber, M., Schübeler, D., Seibler, J., Höxter, M. and Bode, J.** (1999). Efficient FACS selection procedure for cells undergoing FLP-mediated site-specific conversions. Technical Tips Online, TO1668 (<http://tto.trends.com>).
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T.** (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, London.
- Jarman A. P. and Higgs D. R.** (1988). Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J.* **7**: 3337-3344.

- Jenuwein, T., Forrester W., Fernandez-Herrero, L., Laible, G., Dull, M. and Grosschedl, R.** (1997). Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* **385**: 269-272.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kaas, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* **19**: 187-191.
- Jordan, M., Schallhorn, A. and Wurm, F. M.** (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucl. Acids Res.* **24** (4): 596-601.
- Kalos, M. and Fournier, R. E. K.** (1995). Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the Apolipoprotein B chromatin domain. *Mol. Cell. Biol.* **15** (1): 198-207.
- Käs, E., Chasin, L. A.** (1987). Anchorage of the chinese hamster dihydrofolate reductase gene to the nuclear scaffold occurs in an intragenic region. *J. Mol. Biol.* **198**: 677-692.
- Käs, E., Izaurrealde, E., and Laemmli, U. K.** (1989). Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts. *J. Mol. Biol.* **210** (3): 587-599.
- Käs, E., Poljak, L., Adachi, Y. and Laemmli, U. K.** (1993). A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase-II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin. *EMBO J.* **12**: 115-126.
- Kay, V. and Bode, J.** (1994). Binding specificity of a nuclear scaffold: Supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached-region DNA. *Biochemistry* **33**: 367-374.
- Kay, V. and Bode, J.** (1995). Detection of scaffold-attached regions (SARs) by in vitro techniques: activities of these elements in vivo. *Methods in molecular and cellular biology* **5**: 186-194.
- Kellum, R. and Schedl, P.** (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* **64**: 941- 950.
- Kellum, R. and Schedl, P.** (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2424-2431.
- Kilby, N. J., M. Snaith and J. Murray.** (1993). Site specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**: 413-421.
- Klehr, D.** (1991). Untersuchungen zur Steigerung der Transkription durch cis-agierende SAR-Elemente in Mammaliazellen. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

- Klehr, D., Maaß, K. and Bode, J.** (1991). Scaffold-attached regions from the human interferon Beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* **30**: 1264-1270.
- Klehr, D., Schlake, T., Maaß, K. and Bode, J.** (1992). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* **31**: 3222-3229.
- Kouzarides, T.** (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 198-209.
- Kühn, R. and Schwenk, F.** (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Op. In Immunology* **9**: 183-188.
- Lau, S., Jardine, K. and McBurney, M. W.** (1999). DNA methylation pattern of a tandemly repeated LacZ transgene indicates that most copies are silent. *Develop. Dynam.* **215**: 126-138.
- Levy-Wilson, B. and Fortier, C.** (1989). The limits of the DNaseI-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene. *J. Biol. Chem.* **264**: 21196-21204.
- Lewis, C. D., Lebkowski, J. S., Daly, A. K. and Laemmli, U. K.** (1984). Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J. Cell Sci.* **1**: 103-122.
- Li, Q., Harju, S. and Peterson, K. R.** (1999). Locus control regions coming of age at a decade plus. *Trends Genet.* **15** (10): 403-408.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. and Kain, S. R.** (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* **273** (52): 34970-34975.
- Li, Z., Stark, G., Goetz, J., Ruelicke, T., Mueller, U. and Weissmann, C.** (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6158-62.
- Litt, M. D., Simpson, M., Recillas-Targa, F., Prioleau, M. N. and Felsenfeld, G.** (2001). Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* **20** (9): 2224-2235.
- Logie, C. and Stewart, A. F.** (1995). Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5940-5944.
- Ludérus, M. E. E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J. L., Grande, M. A., de Jong, L. and van Driel, R.** (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**: 949-959.

- Ludérus, M. E. E., Den Blaauwen, J. L., De Smit, O. J. B., Compton, D. A., and Van Driel, R.** (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6297-6305.
- Lyznik, L. A., Mitchell, J. C., Hirayama, L. and Hodges, T. K.** (1993). Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res.* **21**: 969-975.
- Marshall, E.** (1997). The mouse that prompted a roar. *Kommentar in Science* **277**: 24-25.
- Martens, J. H. A., Verlaan, M., Kalkhoven, M., Dorsman, J. C. and Zantema, A.** (2002). Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-Scaffold Attachment Factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **22** (8): 2598-2606.
- Martin, D. I. K. and Whitelaw, E.** (1996). The vagaries of variegating transgenes. *BioEssays*. **18**(11): 919-923.
- Metzger, D. and Feil, R.** (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 470-476.
- Meyers, E. N., Lewandowski, M. and Martin G. R.** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**: 136-141.
- Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J.** (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* **29**: 7475-7485.
- Miller, T. W., Huang, C.-Y. and Pogo, A. O.** (1978). Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA. *J. Cell Biol.* **76**: 675-691.
- Mirkovitch, J., Mirault, M. E. and Laemmli, U. K.** (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**: 223-232.
- Mirkovitch, J., Gasser, S. M., and Laemmli, U. K.** (1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200** (1): 101-109.
- Mishra, K. and Karch, F.** (1999). Boundaries that demarcate structural and functional domains of chromatin. *J. Biosci.* **24** (3): 377-399.
- Moleté, J. M., Petrykowska, H., Bouhassira, E. E., Feng, Y. Q, Miller, W. and Hardison, R. C.** (2001). Sequences flanking hypersensitive sites of the β -globin locus are required for synergistic enhancement. *Mol. Cell. Biol.* **21** (9): 2969-2980.
- Mulligan, R. C.** (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**: 926-932.
- Nabirochkin, S., Ossokina, M. and Heidmann, T.** (1998). A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence. *J. Biol. Chem.* **273** (4): 2473-2479.

- Nagy, A.** (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**: 99-109.
- Namciu, S. J., Blochlinger, K. B., and Fournier, R. E.** (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **18** (4): 2382-2391.
- Nan, X., Ng, H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Nehlsen, K.** (2000). Charakterisierung und wiederholte Nutzung chromosomaler Integrationsstellen. Diplomarbeit. Universität Hannover.
- O'Gorman, S., Fox, D. T. and Wahl, G. M.** (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**: 1351-1355.
- Palmer, T. D., Rosman, G. C., Osborne, W. A., Miller, A. D.** (1991). Genetically modified skin fibroblast persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1330-1334.
- Pantano, T., Jolivet, G., Prince, S., Menck-Le Bourhis, C., Maeder, C., Viglietta, C., Rival, S. and Houdebine, L. M.** (2002). Effect of the rabbit α s1-casein gene distal enhancer on the expression of a reporter gene *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**: 53-61.
- Paul, A. L. and Ferl, R. J.** (1998). Higher order chromatin structures in maize and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10** (8): 1349-1359.
- Paulson, J. R. and Laemmli, U. K.** (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**: 817-828.
- Pham, C., MacIvor, D., Hug, B., Heusel, J., and Ley, T.J.** (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *PNAS* **93**, 13090-13095.
- Phi-Van, L. and Strätling, W. H.** (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J.* **7**: 655-664.
- Phi-Van, L. and Strätling, W. H.** (1996). Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochemistry* **35**: 10735-10742.
- Pikaart, M. I., RecillasTarga, F. and Felsenfeld, G.** (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Develop.* **12**: 2852-2862.

- Poljak, L., Seum, C., Mattioni, T. and Laemmli, U. K.** (1994). SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4386-4394.
- Potts, W., Tucker, D., Wood, H. and Martin, C.** (2000). Chicken β -globin insulators function to reduce variability in transgenic founder mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **273**: 1015-1018.
- Prioleau, M. N., Nony, P., Simpson, M. and Felsenfeld, G.** (1999). An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* **18 (14)**: 4035-4048.
- Ramirez-Solis, R., Davis, A. C. and Bradley, A.** (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* **225**: 855-878.
- Razin, A.** (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J.* **17 (17)**: 4905-4908.
- Renz, A., and Fackelmayer, F. O.** (1996). Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-40.
- Richard-Foy, H. and Hager, G. L.** (1987). Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV-promotor. *EMBO J.* **6 (8)**: 2321-2328.
- Rivella, S., Callegari, J. A., May, C., Tan, C. W. and Sadelain, M.** (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J. Virol.* **74 (10)**: 4679-4687.
- Robinett, C. C., O'Connor, A. and Dunaway, M.** (1997). The repeat organizer, a specialized insulator element within the intergenic spacer of the *Xenopus* rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2866-2875.
- Rodriguez, C. I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A. F. and Dymecki, S. M.** (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-*loxP*. *Nat. Genet.* **25**: 139-140.
- Roemig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A.** (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-3440.
- Roseman, R. R., Pirrotta, V. and Geyer, P. K.** (1993). The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J.* **12**: 435-442.
- Sadowski, P. D.** (1993). Site-specific genetic recombination: hops, flips and flops. *FASEB J.* **7**: 760-767.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.

Saitoh, N., Bell, A. C., Recillas-Targa, F., West, A. G., Simpson, M., Pikaart, M. and Felsenfeld, G. (2000). Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken β -globin domain. *EMBO J.* **19** (10): 2315-2322.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: Developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 521-527.

Schaft, J., Ashery-Padan, R., van der Hoeven, F. Gruss, P. and Stewart, A. F. (2001). Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis* **31**: 6-10.

Schlake, T. and Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* **33**: 12746-12751.

Schlake, T., Klehr-Wirth, D., Yoshida, M., Beppu, T. and Bode, J. (1994). Gene expression within a chromatin domain: the role of core histone hyperacetylation. *Biochemistry* **33**: 4197-4206.

Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S. and Capecchi, M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (25): 13702-13707.

Scholz, O. Thiel, A., Hillen, W. and Niederweis, M. (2000). Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1565-1570.

Schübeler, D., Mielke, C., Maaß, K. and Bode, J. (1996). Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context dependent manner. *Biochemistry* **35**: 11160-11169.

Schübeler, D. (1998). Sequenzspezifische Rekombination zur Expression von Fremdgenen und zur Analyse cis-agierender Elemente. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Schübeler, D., Maaß, K. and Bode, J. (1998). Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry*. **37**: 11907-11914.

Scott, K. C., Taubman, A. D. and Geyer, P. K. (1999). Enhancer blocking by the *Drosophila* gypsy insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength. *Genetics* **153**: 787-798.

Seibler, J. and Bode, J. (1997). Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay. *Biochemistry* **36**: 1740-1747.

- Seibler, J., Schübeler, D., Fiering, S., Groudine, M. and Bode, J.** (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by FLP recombinase: An efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* **37**: 6229-6234.
- Seibler, J.** (1999). Sequenzspezifische Rekombination zur gezielten Manipulation des Mammaliagenoms. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Senecoff, J. F. and Cox, M. M.** (1986). Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J. Biol. Chem.* **261**: 7380-7386.
- Silver, D. P. and Livingston, D. M.** (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol. Cell* **8**: 233-243.
- Simon, J. A. and Tamkun, J. W.** (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 210-218.
- Simpson, R. T.** (1986). Nucleosome positioning *in vivo* and *in vitro*. *BioEssays*. **4(4)**: 172-176.
- Singh, G. B., Kramer, J. A., and Krawetz, S. A.** (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* **25 (7)**: 1419-1425.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spana, C. and Corces, V. G.** (1990). DNA bending is a determinant of binding specificity for a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* **4**: 1505-1515.
- Stief, A., Winter, D. M., Strätling, W. H. and Sippel, A. E.** (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position- independent gene activity. *Nature (London)* **341**: 343-345.
- Struhl, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**: 599-606.1
- Stünkel, W., Huang, Z., Tan, S. H., O'Connor, M. J. and Bernard, H. U.** (2000). Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J. Virol.* **74 (6)**: 2489-2501.
- Taboit-Dameron, F., Malassagne, B., Viglietta, C., Puissant, C., Leroux-Coyau, M., Chéreau, C., Attal, J., Weill, B. and Houdebine, L. M.** (1999). Association of the 5'HS4 sequence of the chicken β -globin locus control region with human EF1 α gene promoter induces ubiquitous and high expression of human CD55 and CD59 cDNAs in transgenic rabbits. *Transgenic Research* **8**: 223-235.
- Tan, S. H., Bartsch, D., Schwarz, E. and Bernard, H. U.** (1998). Nuclear matrix attachment regions of the human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J. Virol.* **72**: 3610-3622.

- Taniguchi, M., Sanbo, M., Watanabe, S., Naruse, I., Mishina, M. and Yagi, T.** (1998). Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucl. Acids Res.* **26** (2): 679-680.
- Thoma, F.** (1988). The role of histone H1 in nucleosomes and chromatin fibers. *Architecture of eukaryotic genes* (G. Kahl, Ed.). 163; VCH, Weinheim.
- Thompson, E. M., Christians, E., Stinnakre, M. G. and Renard, J. P.** (1994). Scaffold attachment regions stimulate HSP70.1 expression in mouse preimplantation embryos but not in differentiated tissues. *Mol. Cell. Biol.* **14** (7): 4694-4703.
- Thorpe, H. M., Wilson, S. E. and Smith, M. C.** (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage Φ C31. *Mol. Microbiol.* **38**: 232-241.
- Thyagarajan, B., Guimarães, M. J., Groth, A. C. and Calos, M. P.** (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**: 47-54.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S. and Calos, M. P.** (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage Φ C31 integrase. *Mol. Cell. Biol.* **21** (12): 3926-3934.
- Travers, A. A.** (1987). DNA bending and nucleosome positioning. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 108-112.
- Udvardy, A.** (1999). Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J.* **18** (1): 1-8.
- Unsinger, J.** (2001). Entwicklung regulierbarer retro- und adenoviraler Vektoren für die Gentherapie. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Van der Vlag, J., den Blaauwen, J. L., Sewalt, R. G. A. B., van Driel, R. and Otte, A. P.** (2000). Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J. Biol. Chem.* **275** (1): 697-704.
- Verhoeven, E., Hauser, H. and Wirth, D.** (1998). Efficient targeting of retrovirally FRT-tagged chromosomal loci. Technical Tips Online T01515 (<http://tto.trends.com>).
- Villemure, J. F., Savard, N. and Belmaaza, A.** (2001). Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken β -globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J. Mol. Biol.* **312**: 963-974.
- Volkert, F. C., Wilson, D. W. and Broach, J. R.** (1989). Deoxyribonucleic acid plasmids in yeast. *Microbiological Reviews* **53** (3): 299-317.
- Von Kries, J. P., Buhrmester, H. and Strätling, W. H.** (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: Identification, purification, and mode of binding. *Cell* **64**: 123-135.

Wade, P.A., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *TIBS* **22**: 128-132.

Walters, M. C., Magis, W., Fiering, S., Eidemiller, J., Scalzo, D., Groundine, M. and Martin, D. I. K. (1996). Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes Dev.* **10**: 185-195.

Walters, M. C., Fiering, S., Bouhassira, E. E., Scalzo, D., Goeke, S., Magis, W., Garrick, D., Whitelaw, E. and Martin, D. I. K. (1999). The chicken beta-globin 5' HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. *Mol Cell Biol* **19**: 3714-3726.

Wan, K. M., Nickerson, J. A., Krockmalnic, G. and Penman, S. (1999). The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 933-938.

Weatherall D. J. (1994). The Thalassemias. In: *The Molecular Basis of Blood Diseases*: 157-206.

Weitzel, J. M., Buhrmester, H., and Strätling, W. H. (1997). Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **17** (9): 5656-5666.

Whitelaw, C. B. A., Grolli, S., Accornero, P., Donofrio, G., Farini, E. and Webster J. (2000). Matrix attachment region regulates basal β -lactoglobulin transgene expression. *Gene* **244**: 73-80.

Williams, T. M., Burlein, J. E., Ogden, S., Kricka, L. J. and Kant, J. A. (1989). Advantages of firefly luciferase as an reporter gene: application of the interleukin-2 gene promoter. *Anal. Biochem.* **176**: 28-32.

Wilson, C., Bellen, H. J., Gehring, W. J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **6**: 679-714.

Witherell, G. W. and Wimmer, E. (1993). Cap-independent translation of picornavirus mRNAs. *Virus Strategies* (ed. Doerfler, W. and Böhm, P.). VCH, Weinheim: 238-247.

Wollfe, A. and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**: 817-81.

Wu, H., Liu, X., and Jaenisch, R. (1994). Double replacement: Strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine *Col1 α -1* gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2819-2823.

Zahn-Zabal, M., Kobr., M., Girod, P. A., Imhof, M., Chatellard, P., de Jesus, M., Wurm, F. and Mermod, M. (2001). Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.* **87**: 29-42.

Zhong, X. P. and Krangel, M. S. (1997). An enhancer-blocking element between alpha and delta gene segments within the human T cell receptor alpha/delta locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5219-5224.

Zhou, J. and Levine M. (1999). A novel *cis*-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **99**: 567-575.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulation an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jürgen Bode für das interessante Thema und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dieter Jahn für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gilt Dank für die finanzielle Förderung der Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „EUGEN“ für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Besonders gedankt sei Maria Höxter für die Durchführung der Zellsortierungen sowie André Oumard und Angela Gluch, die sich immer Zeit nahmen, wenn ein Computerproblem auftrat. Claas Wodarczyk, Jacqueline Unsinger und Dirk Spitzer haben für viel Spaß im Laboralltag gesorgt und damit über manche frustrierende Phase hinweggeholfen.

Mein besonderer Dank gilt natürlich den Mitarbeitern des SAR-Labors für die sehr gute Zusammenarbeit, die mir viel Freude bereitet hat. Karin Maaß hat mich stets zuverlässig mit Rat und Tat unterstützt. Angela Gluch, Sandra Götze, Kristina Nehlsen und Ellen Ernst danke ich für die spannenden Diskussionen und vielfältigen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts bei Angela Gluch, Sandra Götze, Kristina Nehlsen und Claas Wodarczyk bedanken.

Jost Seibler danke ich ganz besonders für die anregenden Diskussionen sowie für seine konstruktive Kritik und ermutigenden Ratschläge, welche mir sehr geholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die mir stets mit viel Verständnis zur Seite stand.